

Aus der Abteilung für  
Innere Medizin mit Schwerpunkt Nephrologie und Hypertensiologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. F.C. Luft)  
der Humboldt-Universität Berlin, Charité, Campus Berlin-Buch

**Untersuchungen zu zellulären Mechanismen bei  
ANCA-assoziierten nekrotisierenden Vaskulitiden  
Grundlagen der Aktivierung und der Apoptose  
neutrophiler Granulozyten**

**HABILITATIONSSCHRIFT**

Zur  
Erlangung der venia legendi  
für das Fach Innere Medizin  
der Humboldt-Universität Berlin

vorgelegt von:  
Dr. Ralph Kettritz

Berlin

1999

## Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Nosologie der nekrotisierenden systemischen Vaskulitiden	7
1.2	Die Pathophysiologie ANCA-assoziiierter systemischer Vaskulitiden	9
1.2.1	Charakterisierung der ANCA	9
1.2.2	Die Interaktion von ANCA mit neutrophilen Granulozyten	10
1.2.3	Die Interaktion von ANCA-aktivierten neutrophilen Granulozyten mit Endothelzellen	11
1.3	Fragestellungen der Arbeit	12
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Puffer und Reagenzien	14
2.2	Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten	16
2.3	Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA	16
2.3.1	Präparation der intakten Immunglobuline und der Immunglobulin-Fragmente	16
2.3.2	ELISA zur Bestimmung der Reinheit der ANCA F(ab') <sub>2</sub> - und Fab-Fragmente	17
2.3.3	Durchflußzytometrische Studien zu den Bindungseigenschaften von intakten ANCA und den F(ab') <sub>2</sub> - und Fab-Fragmenten	17
2.3.4	Messung der Superoxid-Generation	18
2.3.5	Quervernetzung von ANCA-Antigenen	18
2.3.6	Blockade des FcγIIa-Rezeptors	19
2.4	Zellkultur	19
2.4.1	Zellkulturbedingungen	19
2.4.2	Beschichtung der Zellkulturplatten	20
2.5	Nachweis der Apoptose	20
2.5.1	Färbung mit Propidium-Jodid	20
2.5.2	Färbung mit Annexin	20
2.5.3	Bestimmung der FcγIII (CD16)-Rezeptor-Expression	21
2.5.4	Zellfärbung mit Wright Giemsa und 4',6 Diamidino-2-Phenylindol	21
2.5.5	DNA-Fragmentations-Assay	21
2.6	Bestimmung der Zelladhäsion und des Zell-Spreadings	22
2.7	Analyse der Proteinexpression	22
2.7.1	Western Blot-Analyse zur Expression von Bcl-2 und Ly-GDI sowie zur Detektion von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen	22
2.7.2	Nachweis der Expression von Bcl-2 mit der Durchflußzytometrie	23
2.7.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse zur Identifizierung von Substraten der Tyrosin-Phosphorylierung	23
2.7.4	Immunzytochemie zur Lokalisation der Tyrosin-Phosphorylierung	24

2.8	Analyse der mRNA-Expression durch RT-PCR	25
2.8.1	Extraktion der RNA	25
2.8.2	Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der RNA	25
2.8.3	Durchführung der RT-PCR	25
2.8.4	Gelelektrophorese	26
2.9	Charakterisierung von differentiell exprimierten Proteinen bei der Apoptose neutrophiler Granulozyten	26
2.9.1	Separation nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen durch Sortierung mit Antikörper-beladenen magnetischen Teilchen	26
2.9.2	Zweidimensionale hochauflösende Gelelektrophorese	27
2.9.3	Enzymatischer <i>in-gel</i> -Verdau, Extraktion und Entsalzung der Proteine	28
2.9.4	Reverse HPLC und Sequenzierung durch Edman-Degradation	28
2.9.5	Peptid-Sequenzierung durch MALDI-MS (Matrix assisted laser desorption/ionization)	28
2.9.6	Peptid-Sequenzierung durch Nanoelektrospray-Massen-Spektrometrie	29
2.9.7	Datenbankvergleiche	29
2.10	Auswertungen	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Mechanismen der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA	30
3.1.1	Bindungsverhalten von ANCA und den korrespondierenden F(ab') <sub>2</sub> - und Fab-Fragmenten	30
3.1.2	Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA und die korrespondierenden F(ab') <sub>2</sub> - und Fab-Fragmente	32
3.1.3	Rolle des Fcγ1a-Rezeptors bei der Aktivierung	38
3.1.4	Regulation der Apoptose durch extrazelluläre Matrix-Proteine	42
3.1.4.1	Effekt von extrazellulären Matrixproteinen auf die spontane und auf die TNFα-vermittelte Apoptose	42
3.1.4.2	Signaltransduktion der Fibronectin-induzierten Akzeleration von TNFα-vermittelter Apoptose	47
3.1.4.2.1	Der Effekt von Inhibitoren der Signaltransduktion	47
3.1.4.2.2	Charakterisierung der Tyrosin-Phosphorylierung	48
3.1.4.2.3	Identifizierung von Ly-GDI als ein Substrat der Tyrosin-Phosphorylierung	51
4	DISKUSSION	58
4.1	Mechanismen der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA	58
4.2	Regulation der Apoptose neutrophiler Granulozyten	61
4.2.1	Die Rolle von Zytokinen	61
4.2.2	Differentiell exprimierte Proteine bei der Apoptose	65
4.2.3	Die Bedeutung von extrazellulären Matrix-Proteinen	69
5	NACHWORT	73

## Abkürzungsverzeichnis

ANCA	anti-neutrophil cytoplasmic antibodies
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrixproteine
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Foreward Scatter
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GM-CSF	Granulozyte/Macrophage Colony-Stimulatory Factor
Gro $\alpha$	Growth-related oncogene alpha
Ig	Immunglobulin
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IL	Interleukin
Ly-GDI	Lymphoid-specific guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor
LPS	Lipopolysaccharid
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRP-8/14	Myeloid-Related Protein-8/14
OD	Optische-Dichte-Wert
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMA	Phorbol 12-Myrstat 13-Azetat
PolyHema	Poly-Hydroxyl-Äthyl-Meth-Acrylat
PR3	Proteinase 3
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	Side Scatter
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha

## Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zu zellulären Mechanismen ANCA-assoziiierter systemischer Vaskulitiden. Es wurden dabei 1) die ANCA-induzierte Aktivierung neutrophiler Granulozyten und 2) die Regulation der Apoptose neutrophiler Granulozyten untersucht. Beide Vorgänge stellen zentrale Krankheitsmechanismen dar. Während die Aktivierung bei der Initiierung der Krankheit eine besondere Rolle spielt, ist die Regulation der Apoptose für die Unterhaltung und die Auflösung der inflammatorischen Antwort von hervorragender Bedeutung.

Um Mechanismen der ANCA-induzierten Aktivierung neutrophiler Granulozyten zu untersuchen und den Teil des ANCA-Moleküles zu identifizieren, der für die Auslösung dieses Vorganges essentiell ist, wurden intakte Antikörper und deren korrespondierende F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmente präpariert und getestet. Das Priming der Zellen mit nicht-aktivierenden Dosen von TNF $\alpha$  führte zur Translokation der ANCA-Antigene auf die äußere Zellmembran. Es wird gezeigt, daß intakte ANCA, ANCA-F(ab')<sub>2</sub>- und ANCA-Fab-Fragmente an TNF $\alpha$ -geprimte neutrophile Granulozyten binden. Dabei resultierte nur aus der Bindung des intakten ANCA-Moleküls und des korrespondierenden ANCA-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes die Generation von Sauerstoffradikalen. Im Gegensatz dazu war für die Aktivierung durch Fab-Fragmente zusätzlich zur Bindung eine Quervernetzung notwendig. Diese Daten demonstrieren, daß die Generation von Superoxid in ANCA-aktivierten neutrophilen Granulozyten nur durch die konzertierte Aktion von Bindung des Auto-Antikörpers und gleichzeitiger Quervernetzung der Ziel-Antigene ausgelöst wird. Es konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß die Blockade des Fc $\gamma$ 1a-Rezeptors zu einer partiellen Hemmung der ANCA-stimulierten Superoxid-Generation führt. Die Ligation des Fc $\gamma$ 2-Rezeptors moduliert die Aktivierung TNF $\alpha$ -geprimter neutrophiler Granulozyten durch ANCA, stellt selbst aber keine *conditio sine qua non* dar.

Der zweite Themenkomplex beschäftigte sich mit der Regulation der Apoptose neutrophiler Granulozyten. ANCA-aktivierte neutrophile Granulozyten produzieren Sauerstoffradikale und geben diese in ihre Umgebung ab. Die Ergebnisse zeigen, daß Superoxid einen wichtigen Mediator für die Apoptose darstellt. Es konnte darüberhinaus demonstriert werden, daß die konstitutive Apoptose neutrophiler Granulozyten durch krankheitsrelevante lösliche Mediatoren beeinflusst wird. Dabei wird die Apoptose-akzelerierende Wirkung des bakteriellen Peptides FMLP und des proinflammatorischen Zytokines TNF $\alpha$  charakterisiert und gezeigt, daß die Wirkung von Zytokinen auf die Apoptose interaktiv sein kann. So weist Interleukin-8, ein Zytokin mit chemotaktischen Eigenschaften, zusätzlich eine Apoptose-verzögernde Wirkung auf. Interleukin-8 hemmte sowohl die spontane als auch die TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose. RT-PCR und Western-Blot-Untersuchungen zeigten, daß die IL-8-Behandlung nicht zur Induktion der Expression des Apoptose-verzögernden Genes Bcl-2 führt.

In den durchgeführten Untersuchungen wurden neue Proteine mit potentieller regulatorischer Bedeutung für das Überleben neutrophiler Granulozyten identifiziert. Apoptotische und nicht-apoptotische Zellen wurden mit Hilfe eines diskriminierenden Antikörpers und magnetischer Teilchen separiert und die Protein-Expressionsmuster wurden in der hochauflösenden

zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert und verglichen. Da neutrophile Granulozyten Proteine neu synthetisieren müssen, um zu überleben, waren besonders solche Proteine interessant, die nach der Kultivierung in den nicht-apoptotischen Zellen stärker exprimiert waren als in den frisch isolierten Zellen und deren Expression in den apoptotischen Zellen vermindert war. Mit Hilfe verschiedener Proteinsequenzierungstechniken wurden die Proteine Aktin, MRP-8, MRP-14,  $\alpha$ -Enolase und Katalase identifiziert. Die beiden letzteren sind interessanterweise kürzlich als Ziel-Antigene von ANCA beschrieben worden. Die potentielle Bedeutung dieser Proteine für die Apoptose wird diskutiert.

Letztlich wurde die Rolle von extrazellulären Matrixproteinen bei der Apoptose von neutrophilen Granulozyten untersucht. Die Resultate zeigen, daß die Interaktion mit extrazellulären Matrixsubstanzen wie Fibronectin zu einer Akzeleration der  $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Apoptose führt. Diese Akzeleration wurde durch Tyrosin-Phosphorylierung vermittelt und Ly-GDI, ein regulatorisches Protein für kleine G-Proteine der Ras-Superfamilie, wurde als ein Substrat der Tyrosin-Kinasen charakterisiert. Ly-GDI wurde nur dann phosphoryliert, wenn  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte neutrophile Granulozyten mit Fibronectin interagierten. Untersuchungen zur Expression von Ly-GDI demonstrierten, daß das intakte Protein in  $\text{TNF}\alpha$ -behandelten Zellen gespalten wurde und daß diese Spaltung durch Fibronectin akzeleriert wurde. Bei der Spaltung von Ly-GDI wurde ein 23 kDa-Fragment generiert. Die spezifische Hemmung von Caspase-3 verhinderte gleichzeitig die Bildung dieses 23 kDa-Fragmentes und die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Apoptose.

Zusammenfassend wurde in Beantwortung der ersten Fragestellung die Quervernetzung der exprimierten ANCA-Antigene durch die ANCA-Antikörper als ein initialer Mechanismus für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten identifiziert. Im zweiten Themenkomplex wurden der Effekt krankheitsrelevanter löslicher Mediatoren sowie die Wirkung der extrazellulären Matrix auf die Apoptose neutrophiler Granulozyten charakterisiert. Letztlich konnten neue Kandidaten-Proteine und neue intrazelluläre Signaltransduktionswege für die Regulation der Lebensspanne neutrophiler Granulozyten identifiziert werden.

## 1 Einleitung

### 1.1 Nosologie der nekrotisierenden systemischen Vaskulitiden

Adolf Kussmaul und Rudolf Maier berichteten im Jahre 1866 über einen Patienten mit einer systemischen nekrotisierenden Vaskulitis (Kussmaul und Maier, 1866). Der 27-jährige Carl Seufarth stellte sich in der Medizinischen Klinik zu Freiburg vor und klagte über akute Krankheitssymptome wie Fieber, Parästhesien, Myalgien bis hin zu Muskellähmungen sowie über ein rückläufiges Urinvolumen. Der Patient verstarb am Ende eines 4-wöchigen Krankenhausaufenthaltes. Bei der Autopsie fielen Gefäßnekrosen mit knötchenförmigen Verdickungen zahlreicher mittelgroßer Arterien auf. Kussmaul und Maier prägten deshalb für dieses Krankheitsbild den Begriff Periarteritis nodosa. In den nächsten Jahrzehnten wurden eine ganze Reihe von Patienten mit nekrotisierender Vaskulitis beschrieben.

Friedrich Wegener, ein Pathologe in Breslau, beschrieb 1936 vier Patienten, die neben der nekrotisierenden Vaskulitis granulomatöse Veränderungen aufwiesen (Wegener, 1939). Pearl Zeek berichtete zu Beginn der 50-er Jahre von Krankheitsformen, die durch einen Befall der kleinen Gefäße mit Einbeziehung der Lunge und eine Nierenbeteiligung mit nekrotisierender Glomerulonephritis auffielen (Zeek, 1952). Zeek nannte dieses Krankheitsbild "Hypersensitivitäts-Vaskulitis", da eine Reihe der Patienten im Rahmen der Prodromalsymptome Medikamente, häufig Sulfonamide, eingenommen hatte. Wir wissen heute, daß dieser Zusammenhang nicht kausal war. Churg und Strauss beschrieben 1951 dreizehn Patienten mit nekrotisierender Vaskulitis, die gleichzeitig Asthma bronchiale, Eosinophilie, granulomatöse Entzündungen und eine nekrotisierende Glomerulonephritis aufwiesen, ein Krankheitsbild, das heute unter dem Namen Churg-Strauss-Syndrom bekannt ist (Churg und Strauss, 1951).

Es wurde offensichtlich, daß es sich - trotz vieler Gemeinsamkeiten - um eine heterogene Gruppe von Krankheiten handelte. Einen Meilenstein beim Versuch der Klassifizierung nekrotisierender Vaskulitiden stellte der Artikel von Godman und Churg aus dem Jahre 1954 dar (Godman und Churg, 1954). Es erfolgte die Abtrennung von vier Krankheitsbildern: die klassische Periarteritis nodosa, die mikroskopische Form der Periarteritis nodosa, die Wegener'sche Granulomatose und die allergische Angiitis mit Granulomatose, das Churg-Strauss-Syndrom. 1994 fand in Chapel Hill, N.C. eine Konsensuskonferenz statt, auf der die heute gültige Nomenklatur der inzwischen angewachsenen Gruppe systemischer Vaskulitiden festgelegt wurde (Jennette, 1994). Der gemeinsame histologische Befund besteht in einer nekrotisierenden Vaskulitis. Ein wichtiges Klassifizierungskriterium ist die Größe des betroffenen Gefäßabschnitts (Abbildung 1).

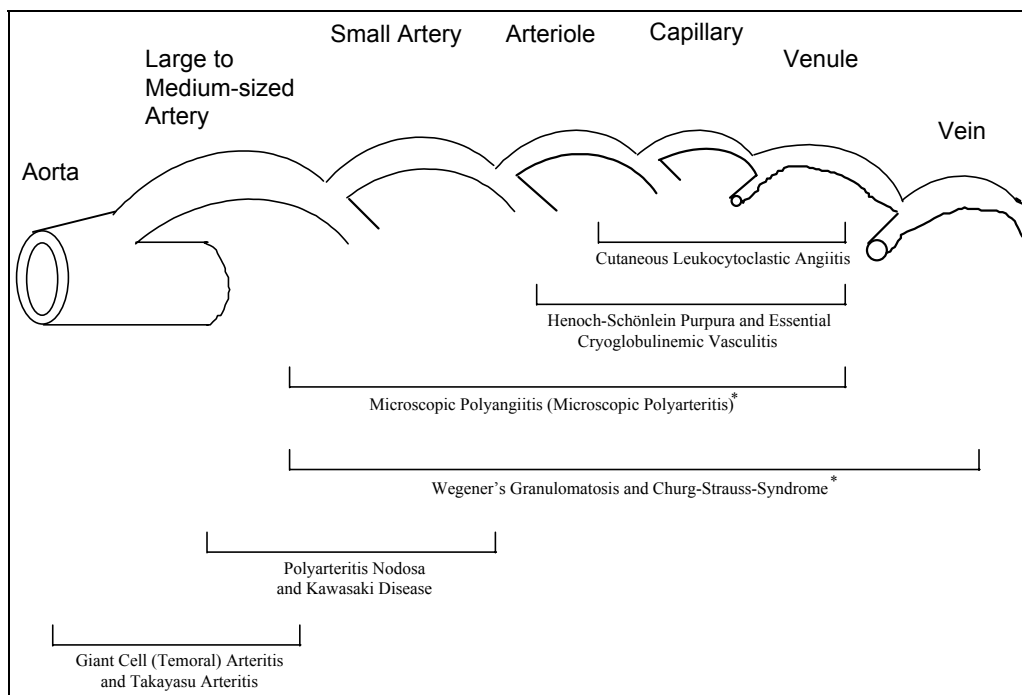


Abbildung 1: Betroffene Gefäßabschnitte bei systemischen Vaskulitiden. Es lässt sich eine deutliche Überlappung erkennen. Small-vessel-Vaskulitiden stellen eine Krankheitsgruppe dar, die immer auch Gefäße distal der Arteriolen befällt. Die mit einem Stern gekennzeichneten Erkrankungen sind durch das Auftreten von ANCA charakterisiert.

Trotz einer deutlichen Überlappung lässt sich eine Gruppe von Erkrankungen abtrennen, bei der stets Gefäße distal der Arteriolen betroffen sind. Diese Vaskulitiden der kleinen Gefäße werden als small-vessel-Vasculitis bezeichnet. Eine Untergruppe dieser small-vessel-Vaskulitiden zeichnet sich durch das Fehlen signifikanter Immunkomplexablagerungen aus. Hierbei handelt es sich um die Wegener'sche Granulomatose, die mikroskopische Polyangitis und das Churg-Strauss-Syndrom. Neue Impulse für das Verständnis zugrundeliegender Mechanismen dieser Krankheitsgruppe löste der Artikel von Davies und Mitarbeitern aus, die 1982 von 8 Patienten mit systemischer nekrotisierender Vaskulitis berichteten, die einen bisher nicht bekannten Auto-Antikörper gegen zytoplasmatische Bestandteile neutrophiler Granulozyten (ANCA) aufwiesen (Davies, 1982). Drei Jahre später wurde in einer holländisch-dänischen Studie festgestellt, daß diese ANCA einen diagnostischen und prognostischen Marker bei Patienten mit Wegener'scher Granulomatose darstellen (van der Woude, 1985). Inzwischen ist die Assoziation von ANCA mit 3 Krankheitsbildern, nämlich der Wegener'schen Granulomatose, der mikroskopischen Polyangitis und dem Churg-Strauss-Syndrom gesichert. Ergebnisse von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen der letzten Jahre haben zu einem pathophysiologischen Konzept geführt, in dem diese Auto-Antikörper eine zentrale Rolle spielen.



## 1.2 Die Pathophysiologie ANCA-assoziiierter systemischer Vaskulitiden

Das Kernstück in den pathophysiologischen Vorstellungen ANCA-assoziiierter systemischer Vaskulitiden bildet die Interaktion zwischen ANCA, neutrophilen Granulozyten und dem Endothel (Abbildung 2). Es wird darüberhinaus spekuliert, daß zusätzlich andere Zellarten wie Monozyten und Lymphozyten, aber auch ein genetischer Hintergrund an der Krankheitsentstehung beteiligt sind (rev. in Kallenberg, 1994; Jennette und Falk, 1997; Nowack, 1998).

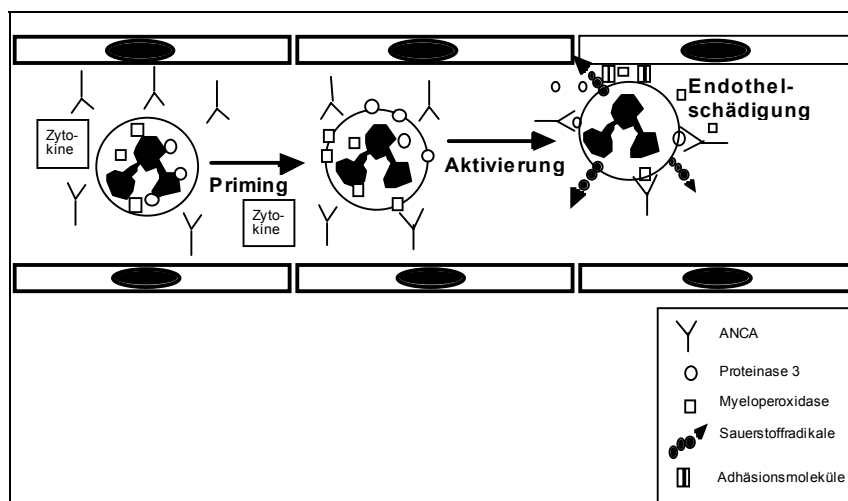


Abbildung 2: Schematische Darstellung zentraler pathophysiologischer Abläufe bei der Entstehung ANCA-assoziiierter Vaskulitiden und Glomerulonephritiden. 1) Priming von PMN durch geringe Zytokinkonzentrationen im Rahmen von Infektionen 2) Aktivierung der geprimten PMN durch ANCA 3) Schädigung von Endothelzellen durch adhärierende ANCA- aktivierte PMN

### 1.2.1 Charakterisierung der ANCA

ANCA stellen eine Gruppe von Auto-Antikörpern mit verschiedenen Antigen-Spezifitäten dar. Zwei Haupt-Muster von ANCA in Ethanol-fixierten Neutrophilen können mittels indirekter Immunfluoreszenz unterschieden werden. C-ANCA zeigen ein diffuses zytoplasmatisches Färbemuster, während p-ANCA durch ein perinukleäres Muster gekennzeichnet sind. Eine 29-kDa-Serin-Protease, Proteinase 3 (PR3), wurde als Haupt-Zielantigen für c-ANCA beschrieben (Goldschmeding, 1989; Niles, 1989; Ludemann, 1990), wohingegen die überwiegende Mehrzahl von p-ANCA-Seren mit Myeloperoxidase reagiert (Falk und Jennette, 1988). Andere seltenere ANCA-Antigene umfassen neben weiteren Serin-Proteasen wie Elastase und Kathepsin G auch Laktoferrin, Lysosom, BPI (bactericidal permeability-increasing protein) und Azurozidin/CAP 37 (rev. in Kallenberg, 1994). Darüberhinaus wurden in jüngster Vergangenheit  $\alpha$ -Enolase und Katalase als zwei weitere Ziel-Antigene von ANCA beschrieben (Moodie, 1993; Roozendaal, 1998). C-ANCA mit Spezifität gegen PR3 sind bei der Wegener'schen Granulomatose vorherrschend, während p-ANCA mit Spezifität gegen MPO bei der mikroskopischen Polyangitis, dem Churg-Strauss-Syndrom und bei der nekrotisierenden Glomerulonephritis mit Halbmondbildung dominieren.

### 1.2.2 Die Interaktion von ANCA mit neutrophilen Granulozyten

Die ANCA-Zielantigene befinden sich innerhalb der Granula von Granulozyten und in den Lysosomen der Monozyten. Das bedeutet, daß eine Interaktion von ANCA mit ihren Ziel-Antigenen nur dann zustande kommt, wenn entweder die Antikörper in die Zellen gelangen oder die Antigene vom Zellinneren auf die Zelloberfläche transloziert werden. Tatsächlich wird eine solche Antigen-Translokation beobachtet, wenn neutrophile Granulozyten mit geringen Mengen von Zytokinen (z.B.  $\text{TNF}\alpha$  oder IL-1) behandelt werden (Falk, 1990; Charles, 1991). Diese kleinen Mengen liegen unterhalb der Konzentrationen, die erforderlich sind, um eine voll ausgeprägte Aktivierung dieser Zellen zu bewirken; der Vorgang wird deshalb als Priming bezeichnet. Eine Antigen-Translokation während des Zytokin-Priming kann *in vitro* mittels Immun-Elektronenmikroskopie sowie mit der Durchflußzytometrie demonstriert werden. Virale und bakterielle Infektionen werden bei Patienten in der Prodromalphase der ANCA-Vaskulitiden beobachtet, und die Bedeutung von *Staphylokokkus aureus* für die Auslösung von Krankheitsrezidiven ist belegt (Stegeman, 1994). Solche Infekte werden als Vermittler eines entsprechenden *in vivo*-Priming angesehen. Verglichen mit Gesunden und mit Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen konnte in *in vivo* - Untersuchungen tatsächlich eine erhöhte Expression von PR3 und MPO bei Patienten mit aktiver Wegener'scher Granulomatose auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten beobachtet werden (Csernok, 1994; Muller Kobold, 1998). Ein völlig neuer Mechanismus der Translokation von PR3 und MPO wurde kürzlich beschrieben. Gilligan et al. zeigten, daß ANCA-Antigene von apoptotischen, nicht aber von nicht-apoptotischen Neutrophilen exprimiert werden und daß zirkulierende ANCA mit diesen Antigenen interagieren (Gilligan, 1996). Diese Daten implizieren einen alternativen Weg, bei dem Apoptose das "klassische" Zytokin-induzierte Priming ersetzen kann.

ANCA, die über ihre Ziel-Antigene an Zytokin-geprimte neutrophile Granulozyten binden, können deren Aktivierung auslösen. In der Arbeitsgruppe von Falk und Jennette wurde 1990 erstmals gezeigt, daß Seren und Immunglobulin-Präparationen von ANCA-Patienten, nicht aber von Kontrollpersonen die Produktion von Sauerstoffradikalen in geprimten Neutrophilen initiieren (Falk, 1990). Dieser Befund wurde von einer Reihe anderer Arbeitsgruppen bestätigt (Keogan, 1992; Mulder, 1994; Porges, 1994). Neben der Fähigkeit von ANCA, die Generation von Sauerstoffradikalen zu stimulieren, sind ANCA auch in der Lage, eine Degranulation der Granulozyten mit einer Freisetzung von Enzymen zu bewirken. Dieser Effekt wurde am Beispiel von  $\beta$ -Glukoronidase und N-Acetyl- $\beta$ -Glukosaminodase gezeigt (Falk, 1990). Eine weitere biologische Wirkung der ANCA besteht in der Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf neutrophilen Granulozyten und in der Promotion ihrer Adhäsion am Endothel (Keogan, 1993; Mayet und Meyer zum Büschenfelde, 1993; Haller, 1996; Johnson, 1997).

### 1.2.3 Die Interaktion von ANCA-aktivierten neutrophilen Granulozyten mit Endothelzellen

In einem nächsten Schritt können ANCA-aktivierte neutrophile Granulozyten, die am Endothel adhären, zur Schädigung von Endothelzellen führen. Die schweren vaskulären Läsionen bei ANCA-Vaskulitiden sind durch infiltrierende neutrophile Granulozyten und Monozyten sowie durch fibrinoide Gefäßwandnekrosen gekennzeichnet (Donald, 1976; Jennette, 1991).

Bei einer physiologischen Antwort auf lokale Entzündungsreize kommt es durch proinflammatorische und chemotaktische Zytokine zum Priming von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Hieraus resultieren die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche und eine Adhäsion am Endothel. In der Abwesenheit von ANCA folgen die Neutrophilen dem chemotaktischen Konzentrationsgradienten, transmigrieren durch das Endothel und erreichen ihre volle Aktivierung erst am Ort der höchsten Konzentration des inflammatorischen Stimulus. Die nachfolgende Generation reaktiver Sauerstoffradikale und die Ausschüttung toxischer Substanzen finden dabei so weit von den Gefäßen entfernt statt, daß keine vaskuläre Schädigung entsteht. Im Gegensatz dazu wird unter Berücksichtigung der bisher diskutierten Daten folgendes *in vivo*-Szenario für ANCA-Vaskulitiden angenommen: Das initiale Priming durch proinflammatorische Zytokine führt zu einer Expression der ANCA-Ziel-Antigene auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten. Im Blutstrom zirkulierende ANCA können nun binden und die neutrophilen Granulozyten bereits während ihrer Transmigration durch die Gefäßwand aktivieren, bevor sie das eigentliche Zentrum der Entzündung erreicht haben. Vorzeitig aktivierte, hochtoxische Granulozyten zerstören auf ihrem Weg durch das Gefäß das Endothel und lösen die Entstehung fibrinoider Gefäßwandnekrosen aus. Diese Hypothese wird durch verschiedene *in vitro*-Beobachtungen gestützt. Die Stimulation mit ANCA bewirkt eine Zunahme der Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen mit einer nachfolgenden Lyse dieser Endothelzellen (Mayet, 1993; Keogan, 1993; Ewert, 1992). Es zeigt sich, daß die von aktivierten Granulozyten abgegebenen Proteasen wie Proteinase 3 und Elastase diese Zytolyse vermitteln können (Ballieux, 1994) und daß Apoptose dabei ein wichtiger Mechanismus ist (Yang, 1996; Taekema Roelvink, 1998).

Um die inflammatorische Reaktion zu beenden, müssen die aktivierten neutrophilen Granulozyten eliminiert werden. Die Apoptose der Granulozyten und ihre nachfolgende Phagozytose sind hierfür entscheidende Mechanismen (Grigg, 1991; Hughes, 1997; Haslett, 1994). Dabei kommt der Balance zwischen der Apoptoserate und der Elimination apoptotischer Zellen eine wichtige Bedeutung zu. Tatsächlich wurden apoptotische neutrophile Granulozyten in den perivaskulären Infiltrationen bei der Vaskulitis nachgewiesen (Savill, 1997).

Aus dem bisher Aufgeführten wird deutlich, daß die ANCA-induzierte Aktivierung, wie in Abbildung 2 dargestellt, durch die transendotheliale Migration der Neutrophilen, deren Kontakt mit extrazellulären Matrixmolekülen und den Prozeß der Apoptose ergänzt werden muß. Ein solches Schema wird in Abbildung 3 dargestellt und als Hypothese der zellulären Mechanismen bei ANCA-Vaskulitiden vorgeschlagen.

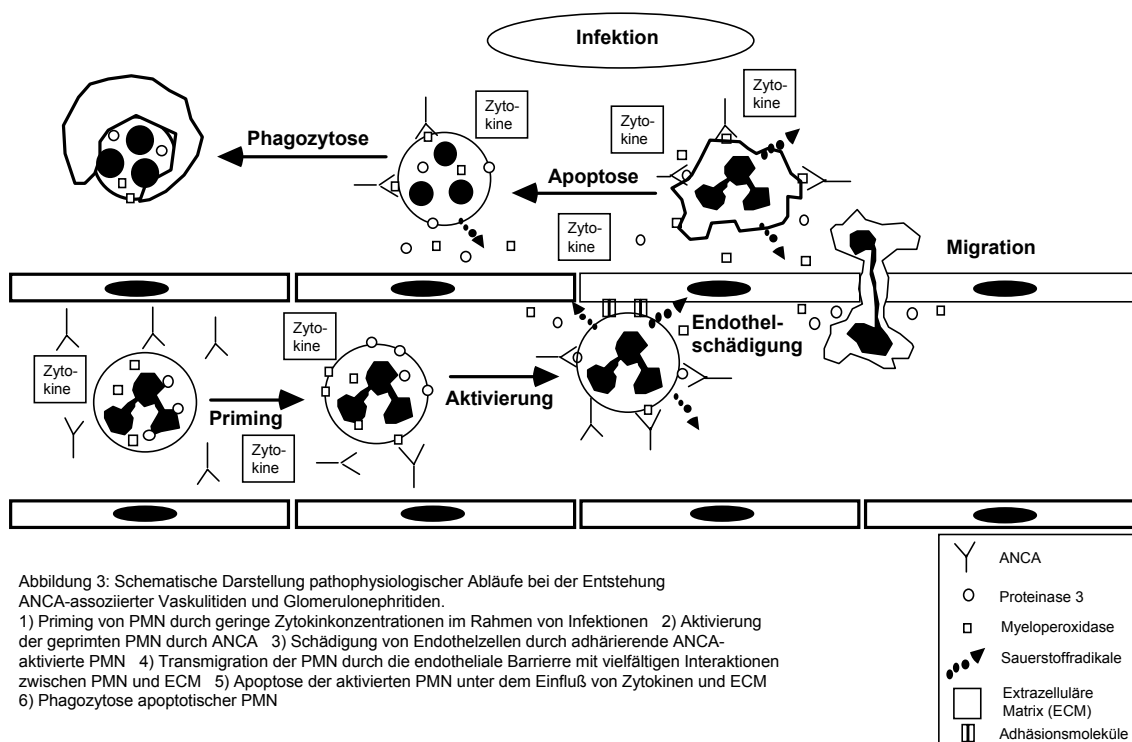


Abbildung 3: Schematische Darstellung pathophysiologischer Abläufe bei der Entstehung ANCA-assoziiierter Vaskulitiden und Glomerulonephritiden. 1) Priming von PMN durch geringe Zytokinkonzentrationen im Rahmen von Infektionen 2) Aktivierung der geprimten PMN durch ANCA 3) Schädigung von Endothelzellen durch adhätierende ANCA-aktivierte PMN 4) Transmigration der PMN durch die endotheliale Barriere mit vielfältigen Interaktionen zwischen PMN und ECM 5) Apoptose der aktivierten PMN unter dem Einfluß von Zytokinen und ECM 6) Phagozytose apoptotischer PMN

### 1.3 Fragestellungen der Arbeit

Innerhalb des vorgeschlagenen Schemas (Abbildung 3) zu pathophysiologischen Abläufen bei ANCA-assoziierten systemischen Vaskulitiden wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Fragen untersucht. Dabei wurden zwei Aspekte, nämlich die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA und die Regulation der Apoptose dieser Zellen herausgegriffen und zum Gegenstand detaillierter Untersuchungen gemacht. Während die Aktivierung eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Krankheit spielt, ist die Regulation der Apoptose für die Auflösung der inflammatorischen Antwort von besonderer Bedeutung.

#### Mechanismen der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA besitzt eine zentrale Bedeutung für ANCA-assoziierte Vaskulitiden. Es bestehen allerdings kontroverse Auffassungen darüber, welcher Teil des ANCA-Moleküls und somit welcher Mechanismus die Aktivierung initiiert. Zu dieser Problematik wurden intakte Immunglobuline von Patienten mit PR3-ANCA oder mit MPO-ANCA sowie die korrespondierenden F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmente präpariert. Die Bindungseigenschaften dieser Moleküle und ihre Fähigkeit, eine Generation von Superoxid auszulösen, wurden getestet.

Im weiteren wurden die Rolle der Quervernetzung der ANCA-Ziel-Antigene bei der Aktivierung und die Bedeutung des Fc $\gamma$ -Rezeptors bei der ANCA-vermittelten Aktivierung untersucht.

### **Bedeutung und Regulation der Apoptose neutrophiler Granulozyten bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden**

Die Apoptose von Entzündungszellen stellt einen zentralen Mechanismus für die Kontrolle lokaler inflammatorischer Prozesse dar. Dabei kommt der Balance zwischen Apoptoserate und Elimination apoptotischer Zellen eine kritische Bedeutung zu. Neutrophile Granulozyten dominieren das frühe perivaskulitische Infiltrat bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden (Donald, 1976; Jennette, 1991), und apoptotische neutrophile Granulozyten wurden in diesen Zellinfiltraten nachgewiesen (Savill, 1997). Gilligan et al. zeigten kürzlich, daß während einer frühen Phase der Apoptose neutrophiler Granulozyten die Translokation von ANCA-Zielantigenen auf die Zelloberfläche erfolgt und daß ANCA ihre Zielantigene auf diesen frühapoptotischen Zellen erkennen und binden (Gilligan, 1996). Somit kann die Apoptose das für die Erkennung und Bindung der ANCA-Antigene notwendige Priming durch Zytokine ersetzen. Die daraus resultierende Interaktion von ANCA mit neutrophilen Granulozyten kann dann zu deren Aktivierung führen. Die Fähigkeit, reaktive Sauerstoff-Radikale zu produzieren, nimmt erst im Verlaufe der Apoptose ab und bleibt für Rezeptor-unabhängige Stimuli sogar bis in späte Phasen erhalten (Whyte, 1993). Der Apoptose kommt unter diesen Umständen somit nicht nur für die Auflösung, sondern auch für die Auslösung der Entzündungsreaktion eine kritische Bedeutung zu.

Die Regulation der Apoptose neutrophiler Granulozyten ist bisher unzureichend verstanden. Es wurden zunächst Experimente durchgeführt, die den Effekt von Zytokinen, die bei ANCA-Vaskulitiden eine wichtige Rolle spielen, auf die Neutrophilen-Apoptose untersuchten. Weitere Experimente charakterisierten die Bedeutung der Superoxid-Generation in diesem Prozeß.

Um intrazelluläre Mechanismen der Apoptose zu analysieren, wurden mit Hilfe magnetischer Zellseparationstechniken, der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese und der Proteinsequenzierung, Untersuchungen zur differentiellen Expression von intrazellulären Proteinen durchgeführt.

Die Adhäsion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten an das Endothel und die nachfolgende Migration in das umliegende Gewebe sind zentrale Gesichtspunkte der lokalen Entzündung und spielen in der Pathogenese von Vaskulitiden eine wichtige Rolle. Hierbei entsteht eine Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen in der Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine. In der vorgelegten Arbeit wurde deshalb der Effekt von extrazellulärer Matrix auf die spontane und die TNF $\alpha$ -vermittelte Neutrophilen-Apoptose untersucht. In den darauf folgenden Experimenten wurden die Signaltransduktion der Fibronektin-vermittelten Akzeleration der TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose charakterisiert und Substrate von regulatorischen Tyrosinkinasen analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Puffer und Reagenzien

#### Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Ethanol 99,5% wurde von Merck, Darmstadt bezogen; Tween-20 von Serva, Heidelberg; Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Natriumdodecylsulfat (SDS) von Merck, Darmstadt; RNA-STAT von Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA; Trizol von GibcoBRL, Eggenstein; Ultra-Pure DNA Grade-Agarose von BioRad, München; P:C:IA enthält Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 und wurde von GibcoBRL, Eggenstein erworben; modifiziertes Wright-Giemsa und 4',6 Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) von Sigma, Dreisenhofen; NP 40 von Amersham, Little Chalfont, UK; Tetramethylethyldiamid (TEMED) von BioRad, München; Rinderserumalbumin (BSA), Propidium-Jodid und Dnase-freie Rnase von Sigma, Dreisenhofen; Ponceau S-Lösung von Seromed, Berlin; Ethidiumbromid von GibcoBRL, Eggenstein; Proteinmarker (prestained low/high range) und BioRad Protein Assay von BioRad, München; DNA-Standard, 1 kB-Leiter von GibcoBRL, Eggenstein; RT (reverse transcriptase)-PCR Kit, inclusive der Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (G3PDH) Primer von Clontech, Palo Alto, CA, USA; Histopaque 1083 von Sigma, Dreisenhofen; 19G Venofix Flügelkanülen und 50 ml Perfusorspritzen von Braun, Melsungen; Plasmagel von Cell Products Inc., Buffalo, NY, USA; Pepsin von Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, USA; p-Nitrophenyl Phosphat Disodium von Sigma, St Louis, MO, USA; Limulus Amoebocytenlysat-Assay von Bio Whittaker, Walkersville, MA, USA; Annexin V als ApoAlert Kit von Clontech, Palo Alto, CA, USA; Dynal RAM IgG1 CELlection Kit mit Dynabeads für Ratte anti-Maus IgG1 von Dynal A.S., Oslo, Norway; Enhanced Chemiluminescence Kit mit Western Blotting Detektionsreagenzien von Amersham Life Science, Little Chalfont, UK; Immunopure Fab Präparations Kit, Protein A Chromatographie-Säule und Protein G Sepharose 4 Fast Flow von Pierce, Rockford, IL, USA; Spectra/Por Dialysemembranen von Spectrum Medical Industries, Laguna Hills, CA, USA; PVDF-Membran von Millipore, Eschborn; 0,2 µm Spritzenfilter von Gelman Science, Ann Arbor, MI, USA; N-Hydroxysuccinimid-Biotin, gekoppelt an einen Abstandshalter (NHS-LC-Biotin), Avidin und 2-(4-Hydroxyazobenzen) Benzolsäure (HABA) Test von Pierce, Rockford, IL, USA; Ferrizytochrom C, Toluidin Blau O, Cytochalasin B, Poly-Hydroxyl-Äthyl-Meth-Acrylat (PolyHema), Poly-L-Lysin, Kollagen Typ I und Typ IV und Laminin von Sigma, Dreisenhofen oder St. Louis, MO, USA; Fibronektin von Boehringer Mannheim, Mannheim; Caspase1- (YVAD-cmk) und Caspase3- (z-DEVD-fmk) Inhibitor von Calbiochem, Bad Soden; Urea von BioRad, München; Träger-Ampholyte, Servalyt von Serva, Heidelberg

#### Puffer

Phosphate-buffered saline (PBS) ohne  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$  sowie Hanks balanced sodium solution (HBSS) von Seromed, Berlin; TBE-Elektrophorese-Puffer hergestellt aus 1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; TBS-T (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL pH 7,5, 0,2%(w/v) Tween 20); NTE-Lysis Puffer bestehend aus 100 mM NaCl, Tris-HCl, pH 7,5 10 mM, 1 mM EDTA, pH 7,9, 1% SDS; TE-Puffer besteht aus 10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA, pH 8,0; PCR II Puffer von Invitrogen, DeSchelp, NL

### Stimuli und Inhibitoren

Rekombinantes humanes TNF $\alpha$  und rekombinantes Interleukin-8 von Genzyme Corp., Boston, MA, USA oder Rüsselsheim; rekombinantes Gro $\alpha$  von Laboserve, Giessen; Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) und Phorbol 12-Myrstate 13-Acetate (PMA) von Sigma, Dreisenhofen oder St. Louis, MO, USA; Staurosporin, Calphostin C, Genistein, SB 202190 und PD 98059 von Calbiochem, Bad Soden

### Zellkultur

RPMI 1640 Medium mit 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub>, ohne L-Glutamin wurden versetzt mit 5 ml Glutamin/ Penicillin, Streptomycin (L-Glutamin 29,2 mg/ml, Penicillin G 10000 U/ml, Streptomycinsulfat 10000  $\mu$ g/ml) (alle Substanzen von Seromed, Berlin); Fetal Calf Serum (FCS) von Seromed, Berlin; 12 x 75 mm Polypropylen-Röhrchen von Falcon, Heidelberg; 12- und 96-Loch Zellkulturplatte sowie Zellkulturflaschen von Costar, Bodenheim

### Antikörper

MOPC21 IgG1 $\kappa$  von Sigma, Dreisenhofen; Alkalische Phosphatase-gekoppelter Maus-AK mit Spezifität gegen humane Fc $\gamma$ -Fragmente und menschliche IgG oder Fc-Teile von Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, PA; F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente eines Ziegen-Antikörpers gegen menschliches oder murines IgG (F(ab')<sub>2</sub>) von Cappel, Organon Tecknika Corp., Durham, NC, USA; die Anti-Phosphotyrosin-Antikörper Py20 von Transduction Lab., Lexington, KY, USA und 1G2 von Boehringer Mannheim, Mannheim; Antikörper gegen humanes Bcl-2 entweder als monoklonaler Maus-Antikörper, Klon 124 von Dako, Hamburg oder als polyklonaler Ratten-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; monoklonaler Maus-Antikörper (IgG1 $\kappa$ , Klon 3G8) gegen Fc $\gamma$ III Rezeptor (CD16) von Pharmingen, San Diego, CA, USA; die monoklonalen Maus-Antikörper (als intaktes IgG1 $\kappa$  oder als F(ab')<sub>2</sub>) gegen den Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor (CD32) von Medarex, West Lebanon, NH, USA; monoklonaler Maus-Antikörper gegen CD9, Klon ALB6 von Coulter-Immunotech, Hamburg; der polyklonale Ziegen-Antikörper gegen Ly-GDI von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; die Maus IgG1 $\kappa$  Negativ-Kontrolle und der FITC-gekoppelte Ziegen-Antikörper (F(ab')<sub>2</sub>) gegen Maus-Ig von Dako, Hamburg

### Geräte

Blot-Apparatur von MilliBlot, Milipore, Eschborn; Densitometer Bio-Rad 580, BioRad, München; Elektrophoresekammer für Acrylamidgele, Mini-Protean II-Kammer, BioRad, München; Elektrophoresekammer für Agarosegele von Agagel, Biometra, Berlin; Thermocycler, PE 9600 von Perkin Elmer, Weiterstadt oder Norwalk, CT, USA; FACScan von Becton Dickinson, Heidelberg oder Mountain View, CA, USA; Dia-Flo Ultrafilters YM 100 von Amicon, Beverly, MA; Konfokales Mikroskopie System, Modell MRC 600 von BioRad, München; Mikroskop, Modell Diaphot, Nikon, Berlin; Ultrazentrifuge, Optima TL, Rotor: TLA 100.3 von Beckman, München

## 2.2 Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten

Gesunden Spendern wurden 45 ml Blut mit einer 19G Venofix Flügelkanüle entnommen. Das Blut wurde in einer heparinisierten 50 ml Perfusorspritze (Luer) gesammelt und mit 15 ml Plasmagel in der Spritze durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Nach einer Stunde Sedimentationszeit bei Raumtemperatur wurde der Überstand über eine 19G Flügelkanüle in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen überführt und mit 7 ml Histopaque 1083 unterschichtet. Nachfolgend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 1200 U/min und 4°C. Zur hypotonen Lyse der kontaminierenden Erythrozyten wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml sterilem Aqua bidest resuspendiert. Nach 20 s wurden 3,33 ml 3,6% NaCl-Lösung zugegeben, um wieder isotone Bedingungen herzustellen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 8 min bei 1100 U/min und 4°C. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in HBSS (für die Versuche zur Bestimmung der Superoxid-Generation) oder in RPMI 1640 Medium (für die Untersuchungen zur Apoptose) resuspendiert.

## 2.3 Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA

### 2.3.1 Präparation der intakten Immunglobuline und der Immunglobulin-Fragmente

Die in den Experimenten verwendeten humanen Immunglobuline wurden aus den Seren von 2 Patienten mit PR3-ANCA bei bioptisch gesicherter Wegener'scher Granulomatose (K.M., R.R.) und von 2 Patienten mit MPO-ANCA-positiver mikroskopischer Polyangiitis (T.R., A.A.) isoliert. Gleichzeitig erfolgte die Präparation von Immunglobulinen aus dem Blut gesunder Spender. Wir versetzten die Seren mit einem gleichen Volumen von gesättigtem Ammoniumsulfat und dialysierten die Proben in einer Spectra/Por Membran über Nacht bei 4°C gegen 20 mM Natrium Phosphat Puffer, pH 7,0 (Bindungspuffer). Die Proben wurden durch einen 0,2 µm Spritzenfilter gefiltert und in eine Protein-G-Affinitätssäule geladen. Das gebundene Immunglobulin wurde mittels 0,1 M Glyzin-HCL Puffer, pH 2,75, (Elutionspuffer) von der Säule abgelöst. Der pH-Wert wurde unmittelbar anschließend durch Zusetzen von 1 M Tris-HCL, pH 9,0, auf 7,0 eingestellt. Die Konzentration des monoklonalen Maus-Antikörpers gegen humane PR3 (IgG1κ), der früher in unseren Labor etabliert und charakterisiert wurde, erfolgte aus dem Zellkulturüberstand unter Verwendung eines Dia-Flo Ultrafilters YM 100 und die weitere Aufreinigung mittels Protein-G-Säulen-Chromatographie. Als Isotypen-Kontrolle für die Experimente mit diesem Antikörper diente ein muriner monoklonaler IgG1κ, der in der Hybridom-Zelllinie MOPC 21 produziert wurde.

F(ab')<sub>2</sub> von humanen ANCA, vom monoklonalen Maus-Antikörper gegen humane PR3 und von Immunglobulinen gesunder Spender wurden nach der Methode von Lamoyi präpariert (Lamoyi, 1986). Dazu wurden die aufgereinigten Immunglobuline über Nacht gegen 0,1 M Natrium Azetat-Puffer (pH 7,0) dialysiert. Nachdem der pH-Wert der Lösung unmittelbar vor der Pepsinspaltung auf 4,25 (humane Immunglobuline) oder 4,0 (Maus-Antikörper) eingestellt wurde, erfolgte die Zugabe von Pepsin bei einer Enzym/Antikörper-Ratio von 1:33. Nach einer Inkubation des Gemisches für 7,5 h bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden erneut gegen Bindungspuffer dialysiert und mittels Säulen-Chromatographie aufgereinigt. Dabei erfolgten soviele



Läufe über die Säule (2-4), bis kein Elutionsgipfel (also kein kontaminierendes, ungespaltenes Immunglobulin) mehr meßbar war.

Fab-Fragmente von humanen ANCA wurden unter Verwendung des Immunopure-Fab-Präparations-Kit hergestellt. Die Papain-Spaltung erfolgte bei 37°C für 9 h, wonach die Proben gegen Protein-A-Bindungspuffer dialysiert wurden. Kontaminierende, intakte Immunglobuline wurden durch die Protein-A-Affinitätssäule entfernt (2-3 Läufe). Die Reinheit der F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Präparationen wurde mit Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) und, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, mittels ELISA nachgewiesen. Die humanen ANCA, der monoklonale Maus-Antikörper gegen humane PR3 und die korrespondierenden F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente wurden auf Alkohol-permeabilisierten neutrophilen Granulozyten getestet und zeigten die entsprechenden c-ANCA- oder p-ANCA-Muster in der indirekten Immunfluoreszenz. Intakte ANCA wurden zusätzlich mittels ELISA auf ihre Reaktivität gegen aufgereinigte PR3 und MPO untersucht.

Die Proteinkonzentrationsmessungen der Antikörper und ihrer Fragmente erfolgten im Coomassie-Protein-Assay. Alle Immunglobulinpräparationen wurden auf Endotoxin getestet und waren im Limulus-Amoebocytenlysat-Assay bei einer Sensitivität von 0,1 ng/ml negativ.

### 2.3.2 ELISA zur Bestimmung der Reinheit der ANCA F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmente

96-Loch-Platten wurden mit 0,75 µg/Loch affinitätsgereinigtem Ziegen-AK mit Spezifität gegen den Fc-Teil von menschlichem IgG beschichtet. Die zu testenden Antikörperfragmente wurden in 100 µl Puffer verdünnt (50 mM Natriumazetat, 100 mM Natriumchlorid, pH 6,0). Verbliebene Bindungsstellen auf den Platten wurden mit 200 µl Blockierpuffer geblockt (PBS/0,05% Tween/0,5% Ziegenserum), und menschliche IgG oder Fc-Teile (aufsteigende Konzentrationen zwischen 1 ng - 5 µg), markiert mit Chromo Pure, wurden zu den wells gegeben. Ein µg/well ANCA F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmente wurden simultan getestet. Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurden 100 µl/well eines Alkalische Phosphatase-gekoppelten Maus-AK mit Spezifität gegen humane Fcγ-Fragmente zugegeben (Verdünnung von 1:20.000). Die Entwicklung erfolgte mit p-Nitrophenyl Phosphat Disodium, bevor der Optische-Dichte-Wert (OD) nach 1 h bei 405 nm bestimmt wurde. Der OD der ANCA F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmente wurde mit der erstellten Standardkurve verglichen und zeigte, daß 1 µg ANCA F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente mit 1-2 ng Fc-Teilen kontaminiert waren und daß 1 µg Fab-Fragmente weniger als 1 ng Fc-Teile enthielt.

### 2.3.3 Durchflußzytometrische Studien zu den Bindungseigenschaften von intakten ANCA und den F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmenten

Die Durchflußzytometrie wurde eingesetzt, um die Bindungseigenschaften von intakten ANCA und den korrespondierenden F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmenten sowie von den intakten Kontroll-Immunglobulinen und den entsprechenden F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten zu untersuchen. Es wurden weiterhin Bindungsstudien mit dem monoklonalen Maus-Antikörper gegen humane PR3 und dem korrespondierenden F(ab')<sub>2</sub>-Fragment durchgeführt. Die Antikörperpräparationen wurden dazu biotinyliert, und die Biotininkorporation wurde mit dem 2-(4-Hydroxyazobenzen)-Benzolsäure-(HABA)-Test kontrolliert. Das Verhältnis von Biotin zum Immunglobulin bzw.

Immunglobulinfragment war wie folgt: 6,0 für PR3-ANCA; 4,8 für PR3-ANCA-F(ab')<sub>2</sub>; 4,3 für PR3-ANCA-Fab und 3,8 für Kontroll-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente.

2,5x10<sup>6</sup> neutrophile Granulozyten wurden mit 1,33 ng/ml TNF $\alpha$  für 15 min bei 37°C geprimt und nachfolgend mit 50  $\mu$ g biotinyliertem Antikörper in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l HBSS für 20 min bei 4°C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen mit kaltem PBS entfernt. Die Zellen wurden mit 200  $\mu$ l (2  $\mu$ g) Fluorescein-Isothiozyanat (FITC)-konjugiertem Avidin für 20 min bei 4°C inkubiert, erneut gewaschen und in 1% Paraformaldehyd fixiert.

Die Bindung des intakten monoklonalen Maus-Antikörpers gegen humane PR3 und des korrespondierenden F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes (je 4  $\mu$ g) wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines FITC-beladenen Schaf-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes untersucht, das gegen Maus-IgG gerichtet ist (20  $\mu$ g/ml). Der MOPC-21 Antikörper diente als Isotypenkontrolle. Die Durchflußzytometrie wurde an einem FACScan durchgeführt, wobei 10.000 Ereignisse akquiriert wurden.

#### 2.3.4 Messung der Superoxid-Generation

Superoxid wurde im Standard-Assay der Superoxiddismutase-hemmbareren Ferrizytochrom-C-Reduktion gemessen. Dazu wurden die neutrophilen Granulozyten mit 5  $\mu$ g/ml Cytochalasin-B für 15 min bei 4°C vorbehandelt (5  $\mu$ g/10<sup>7</sup> Zellen). Das Priming von 2,5x10<sup>6</sup> Zellen erfolgte mit TNF $\alpha$  für 15 min bei 37°C. Dazu kamen 1 ng/ml TNF $\alpha$  (Genzyme Corp., Boston, MA) in den Experimenten mit monoklonalen Maus-Antikörpern gegen humane PR3 und 1,33 ng/ml in den Experimenten mit menschlichen ANCA-Präparationen zum Einsatz. Intakte Immunglobuline, F(ab')<sub>2</sub>, Fab oder Pufferkontrolle wurden zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Gesamt-Assayvolumen betrug 500  $\mu$ l, mit einer finalen Ferrizytochrom-C-Konzentration von 50  $\mu$ M und einer Zellkonzentration von 2,5x10<sup>6</sup>/ml. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt und die Zellen wurden in einer gekühlten Zentrifuge bei 1200 U/min pelletiert. Es erfolgte die Messung der Absorption des Überstandes bei 550 nm in den Proben mit und ohne 125  $\mu$ g/ml SOD (Microplate Autoreader, Bio Tek Instruments). Natrium-Dithionit wurde zu den Proben ohne SOD zugegeben, um eine vollständige Reduktion des Ferrizytochroms zu bewirken, und die Absorption wurde erneut bestimmt. Die Menge an generiertem Superoxid wurde über die Menge des reduzierten Ferrizytochroms berechnet, und die Ergebnisse wurden in nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/2,5x10<sup>6</sup> Zellen/30min angegeben. Jede Bedingung wurde in einer Doppelbestimmung getestet. Die basale Superoxid-Generation der TNF $\alpha$ -geprimten neutrophilen Granulozyten wurde in jedem einzelnen Experiment gemessen und von den Ergebnissen der stimulierten Proben subtrahiert.

#### 2.3.5 Quervernetzung von ANCA-Antigenen

Nach dem Priming von 2,5x10<sup>6</sup> neutrophilen Granulozyten mit TNF $\alpha$  für 15 min bei 37°C wurden ANCA-Fab-Fragmente (125  $\mu$ g/ml) oder F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente des monoklonalen Maus-Antikörper gegen humane PR3 (4  $\mu$ g/ml) für 10 min zugegeben. Danach wurden die ungebundenen Fragmente durch Waschen entfernt, und die Zellen wurden für weitere 30 min bei 37°C in der Anwesenheit von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten eines Ziegen-Antikörpers gegen menschliches (15  $\mu$ g/ml) or

murines (4 µg/ml) IgG (F(ab')<sub>2</sub>) inkubiert. In zwei Experimenten wurde eine zweite Methode verwendet, bei der biotinylierte ANCA-Fab-Fragmente (125 µg/ml) (Patient R.R.) mit Avidin (15 µg/ml) quervernetzt wurden. Als die basale, zu subtrahierende Superoxid-Generation wurde in diesen Experimenten das Waschen von TNF $\alpha$ -geprimten neutrophilen Granulozyten, die nur mit dem sekundären Antikörper bzw. dem Avidin inkubiert wurden, berücksichtigt.

### 2.3.6 Blockade des Fc $\gamma$ IIa-Rezeptors

TNF $\alpha$ -behandelte neutrophile Granulozyten wurden mit sättigenden Dosen eines anti-Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor-Antikörpers (10 µg/ml intakter Antikörper oder dieselbe Menge Fab-Fragmente) inkubiert. Nach 15 min erfolgte die Zugabe der humanen PR3-ANCA (125 µg/ml) oder des monoklonalen Maus-Antikörpers gegen menschliche PR3 (4 µg/ml). Die Generation von Superoxid wurde, wie oben beschrieben, mit dem Standard-Assay der Superoxiddismutase-hemmbareren Ferrizytochrom-C-Reduktion gemessen. In zwei Experimenten wurde ein Zeitverlauf des Effektes der Fc $\gamma$ IIa-Rezeptorblockade auf die ANCA-stimulierte Superoxid-Produktion (Patient K.M.; PR3-ANCA) erstellt. Dazu wurden TNF $\alpha$ -vorbehandelte (1.33 ng/ml) neutrophile Granulozyten entweder mit Fab-Fragmenten eines Anti-Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor-Antikörpers (10 µg/ml) oder mit einer Pufferkontrolle inkubiert, bevor die Stimulation mit 125 µg/ml PR3-ANCA erfolgte. Die Reaktion erfolgte bei 37°C und wurde nach 5, 15, 30 und 60 min gestoppt. Anschließend wurde die Menge an generiertem Superoxid bestimmt. Unspezifische Effekte der Rezeptorblockade wurden bei der Stimulation mit 50 ng/ml PMA und 10<sup>-7</sup> M FMLP untersucht.

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 Zellkulturbedingungen

10 µl Zellsuspension wurden mit 40 µl Trypanblau 0,5% gemischt und 10 µl dieser Mischung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellkonzentration wurde nach Auszählung von drei Proben auf 10<sup>7</sup> Zellen pro ml eingestellt. Bei allen Experimenten lag der Anteil vitaler Zellen, das heißt Trypanblau ausschließender Zellen bei über 95%. Die neutrophilen Granulozyten wurden bei einer Endkonzentration von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml RPMI mit 10% FCS in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Gesamtvolumen von 500 µl, entweder in 12x75 mm Polypropylen-Zellkulturröhrchen oder in beschichteten 12-Loch-Kulturplatten. Wenn angegeben, erfolgte eine Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$ , Interleukin-8, Gro $\alpha$ , FMLP oder PMA. In Experimenten zur Signaltransduktion wurden die Zellen mit Inhibitoren verschiedener Proteinkinasen für 15 min auf Eis vorinkubiert. Sämtliche Versuche wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt und beinhalteten immer die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen. Alle Präparationen und Arbeiten zur Zellkultur wurden unter der Sterilbank unter Verwendung von endotoxinfreien Reagenzien ausgeführt.

### 2.4.2 Beschichtung der Zellkulturplatten

In den Experimenten zum Effekt extrazellulärer Matrixsubstanzen auf die Apoptose wurden Zwölf-Loch-Zellkulturplatten aus Polystyren verwendet, während für den Adhäsionsassay 96-Loch-Platten aus Polystyren zum Einsatz kamen. Um Bedingungen zu erzielen, die eine Adhärenz der Zellen verhindern, erfolgte die Beschichtung mit PolyHema (50 mg/ml). Diese Technik wurde von Folkman erstmals beschrieben (Folkman und Moscona, 1978). Die folgenden Reagenzien wurden zur Beschichtung verwendet, um adhärenzbedingungen zu erreichen: Fibronectin ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), Laminin ( $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), Kollagen I ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), Kollagen IV ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), und Poly-L-Lysin ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Die Beschichtung erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers.

## 2.5 Nachweis der Apoptose

### 2.5.1 Färbung mit Propidium-Jodid

Als eine Methode zur Bestimmung und Quantifizierung der Apoptose wurde die Färbung mit Propidium-Jodid eingesetzt. Dabei wurde der DNA-Gehalt in Ethanol-permeabilisierten Zellen bestimmt. Apoptose führt zu einer Aktivierung von Endonukleasen und somit zur internukleosomalen Spaltung von DNA. Die niedrigmolekularen DNA-Bruchstücke verlassen während des Wasch- und Färbvorganges die Zellen. Die Folge ist ein verminderter DNA-Gehalt apoptotischer Zellen verglichen mit nicht-apoptotischen Zellen. Frisch isolierte oder kultivierte Zellen wurden bei 1100 U/min und  $4^\circ\text{C}$  für 7 min zentrifugiert und vorsichtig in 300  $\mu\text{l}$  PBS/0,5 mM EDTA resuspendiert. 900  $\mu\text{l}$  95% Ethanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) wurden tropfenweise zugegeben, bevor die Zellsuspension für ein bis drei Tage bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt wurde. Danach wurden die Zellen pelletiert (1100 U/min,  $4^\circ\text{C}$ , 7 min) und in 200  $\mu\text{l}$  PBS/0,5 mM EDTA/1% BSA resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  PBS mit 16,0  $\mu\text{g}$  DNase-freier RNase und 400  $\mu\text{l}$  PBS mit 40  $\mu\text{g}$  Propidium Jodid. Die Zellen wurden 15 min bei Raumtemperatur, in Dunkelheit und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Um zu gewährleisten, daß die niedrigmolekularen DNA-Bruchstücke die permeabilisierten Zellen verlassen können, wurden die Proben für 6-8 h im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Messungen der Apoptoserate erfolgte mit einem Durchflußzytometer FACScan (Fluorescence-activated cell sorter). Im Programm LysisII/Acquisition (Becton Dickinson) wurden pro Probe 10.000 Ereignisse eingelesen und gespeichert. Die Auswertung wurde mit der Software LysisII/Analysis vorgenommen. Zellgröße und Granularität wurden anhand der Lightscatter (FSC-Height und SSC-Height) ermittelt. Durch spezielle Gating-Techniken mit den Parametern FL2-Area und FL2-Width erfolgte der Ausschluß von Zell-Doublets und -Triplets. Der auf Einzelzellebene bestimmte DNA-Gehalt korreliert mit der Fluoreszenzintensität des Propidium-Jodids im Kanal FL-2.

### 2.5.2 Färbung mit Annexin

Ein frühes Apoptosezeichen ist die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran auf die Zelloberfläche. FITC-markiertes Annexin-V, ein Protein mit starker Affinität zu Phosphatidylserin, kann somit an dieses Phospholipid binden (Martin., 1995). Die Fluoreszenzintensität des FITC ist proportional zur Menge an exprimiertem Phosphatidylserin und

damit zur Apoptoserate der Zellen. Zur Annexin V-Färbung benutzten wir das ApoAlert<sup>TM</sup>-Annexin-V-Apoptosis-Kit.  $1 \times 10^6$  frisch isolierte oder kultivierte Zellen wurden einem Waschvorgang mit PBS unterzogen, anschließend pelletiert und in 200  $\mu$ l Bindungspuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 10  $\mu$ l Annexin-V (Endkonzentration 1  $\mu$ g/ml) wurden die Zellen in der Suspension vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Danach folgte die Analyse in der Durchflußzytometrie. Pro Probe wurden 10.000 Ereignisse acquiriert und gespeichert. Die Auswertung wurde mit der Software LysisII/Analysis vorgenommen.

### 2.5.3 Bestimmung der Fc $\gamma$ III (CD16)-Rezeptor-Expression

Die spontane Apoptose neutrophiler Granulozyten führt zur proteolytischen Abspaltung des Fc $\gamma$ III-Rezeptors (Homburg, 1995). Wir verwendeten eine Färbung der Zellen mit einem FITC-gekoppelten monoklonalem Antikörper gegen den Fc $\gamma$ III-Rezeptor, um den Prozentsatz apoptotischer Zellen zu quantifizieren. Frisch isolierte oder kultivierte neutrophile Granulozyten wurden dazu einmal in eiskaltem PBS gewaschen.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden anschließend mit 10  $\mu$ l des FITC-gekoppelten Antikörpers in einem Volumen von 100  $\mu$ l PBS für 20 min auf Eis inkubiert, gewaschen und im FACScan analysiert. Pro Probe wurden 10.000 Ereignisse eingelesen und gespeichert. Die Auswertung erfolgte mit der Software LysisII/Analysis.

### 2.5.4 Zellfärbung mit Wright Giemsa und 4',6 Diamidino-2-Phenylindol

Morphologische Zeichen der Apoptose sind ausführlich durch Kerr et al. beschrieben worden (Kerr, 1972) und beinhalten das Schrumpfen der Zellen, Kernpyknosen, die Kondensation von Kern und Zytoplasma sowie die Bildung sogenannter apoptotischer Körperchen. Für diese Untersuchungen zentrifugierten wir frisch isolierte oder kultivierte Zellen mit einer Zellzentrifuge auf einen Objektträger. Die Präparate wurden in 70% Ethanol fixiert und anschließend entweder mit modifizierter Wright-Giemsa-Lösung oder mit DAPI (1  $\mu$ g/ml) gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Licht- (Wright-Giemsa) bzw. UV-Mikroskopie (DAPI).

### 2.5.5 DNA-Fragmentations-Assay

Frisch isolierte oder kultivierte Zellen wurden pelletiert (1100 U/min, 7 min, 4°C) und in 750  $\mu$ l NTE-Lysispuffer resuspendiert. Nach 4-5 h Inkubation bei 37°C erfolgten die Zugabe von 5  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml) und die Fortführung der Inkubation für weitere drei Stunden bei 37°C. Nach Zentrifugation für 20 min (13000 U/min, 4°C) wurde der Überstand, der die Gesamt-DNA enthielt, in ein neues Gefäß überführt. Es erfolgte eine zweimalige Extraktion der DNA durch Zugabe von 750  $\mu$ l P:C:IA (25:24:1) mit anschließender Zentrifugation (13000 U/min, 7 min, RT). Es folgten zwei weitere Extraktionsschritte mit je 750  $\mu$ l C:IA (Chloroform: Isoamylalkohol) (24:1). Das Volumen des zuletzt erhaltenen Überstandes wurde bestimmt und ein Zehntel dieser Menge an 3 M Na-Acetat (pH 5,2) zugesetzt. Die DNA wurde über Nacht bei -20°C in dem 2,2-fachen Volumen absoluten Ethanol präzipitiert. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert (13000 U/min, 15 min, 4°C), der Überstand verworfen und die DNA bei RT getrocknet. Die DNA wurde mit 17  $\mu$ l TE-Puffer/RNase aufgenommen und 15 min bei 37°C inkubiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden 2  $\mu$ l der DNA-Suspension in 98  $\mu$ l TE-

Puffer gegeben. Die Extinktion dieser Lösung wurde bei 260 nm gemessen. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:  $A_{260} \times 50$  (Verdünnungsfaktor)  $\times 50$  (Konstante für DNA) / 1000 = Konzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Für die Herstellung eines 1,5% Agarosegels wurden 45 g Agarose (Serva) mit 30 ml TBE-Puffer aufgekocht, 1,5  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid zugefügt (Endkonzentration 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und in die Gelkammer gegossen. Jeweils 7  $\mu\text{g}$  DNA wurden pro Bahn geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert im UV-Licht. Die auf diese Weise dargestellten DNA-Banden wurden mit einer Computerkamera fotografiert und im Tiff-Format auf Diskette gespeichert.

## 2.6 Bestimmung der Zelladhäsion und des Zell-Spreadings

96-Loch-Zellkulturplatten wurden mit PolyHema, Fibronectin oder mit Poly-L-Lysin beschichtet.  $1 \times 10^5$  neutrophile Granulozyten in 100  $\mu\text{l}$  Medium wurden in jedes Loch pipettiert und mit Pufferkontrolle oder 20 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert. Die  $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung erfolgte entweder ohne oder mit einer Vorinkubation der Zellen für 20 min in 50  $\mu\text{M}$  Genistein auf Eis. Die Platten wurden für die angegebenen Zeitabschnitte in einem Inkubator bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Der Überstand mit den nicht-adhären Zellen wurde anschließend verworfen. Die Platten wurden 3x mit PBS gewaschen und anschließend mit 10% Formalin für 15 min bei RT fixiert. Nach Färbung der verbliebenen adhären Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Toluidin Blau wurden die Platten 3x mit destilliertem Wasser gewaschen, und die Zellen wurden in 2% SDS für 10 min lysiert. Die Bestimmung der OD (optical density) erfolgte bei 600 nm. Jedes Experiment wurde als 3fach-Bestimmung durchgeführt. Wir etablierten eine Dosis-Wirkungsbeziehung in Form einer Standardkurve für ansteigende Zellzahlen zwischen  $1 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$ . Der R-Wert von 0,983 demonstriert eine sehr enge Korrelation zwischen der Zellzahl und dem OD. Die Beurteilung der Adhärenz der Zellen auf PolyHema erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskopie, da der Toluidin Blau-Assay mit dem PolyHema-Reagenz interferierte.

Für die Einschätzung des Zell-Spreadings benutzten wir die Phasenkontrastmikroskopie. Die Zellen wurden dazu, wie im Absatz Zellkultur beschrieben, in 12-Loch-Platten inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die nicht-adhären Zellen verworfen und der Anteil der Zellen, die ein Spreading aufwiesen, bestimmt. Jede Probe wurde von 2 Untersuchern bewertet. Ein Minimum von 100 Zellen pro Probe wurden ausgewertet und solche Zellen, die im Phasenkontrast dunkel erschienen, vergrößert waren und unregelmäßige Konturen zeigten, galten als positiv im Sinne des Spreadings.

## 2.7 Analyse der Proteinexpression

### 2.7.1 Western Blot-Analyse zur Expression von Bcl-2 und Ly-GDI sowie zur Detektion von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen

Die Zellen wurden nach der Inkubation unter den entsprechenden Versuchsbedingungen geerntet, in eiskaltem Puffer lysiert (20 mM Tris-HCL, pH 8.0 mit 138 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 10% Glycerol, 0.2 mM Natriumorthovanadat, 1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin, 0.1 mM Quercetin, 5 mM Jodoacetamid) und für 20 Minuten auf Eis gelagert. Nach der

Zentrifugation (12.000 G, 4°C) wurde der Überstand abpipettiert und die Proteinkonzentration mit dem BCA-Proteinbestimmungs-Assay gemessen. Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Nach Kochen der Proben bei 95°C in Ladepuffer (250 mM Tris-HCL, pH 6,8 mit 4% SDS, 20% Glycerol, 0.01% Bromphenolblau und 0,05% Mercaptoethanol) für 5 Minuten wurden 30 µg Protein/Bahn in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Da die mit SDS beladenen Proteine von der Anode zur Kathode wandern, können die Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen werden. Vor dem Blotten in semi-dry-Technik wurden das Gel und die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran in Transfer-Puffer eingelegt, wobei die Membran zusätzlich zuvor mit Methanol benetzt wurde. Der Transfer erfolgte innerhalb von 45 min mit einer Stromstärke von 2,5 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche. Die Membran wurde über Nacht in 5% Magermilch/TBS-T bei 4°C geblockt, in TBS-T gewaschen (40 min mit 4-maligem Wechsel der Waschlösung) und anschließend mit dem entsprechenden primären Antikörper (in 1% BSA/TBS-T verdünnt) für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der Blot mit dem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (1:10.000 in 1%BSA/TBS-T verdünnt) für 1 h bei RT inkubiert, gewaschen und mit Chemielumineszenz-Substrat entwickelt. Am Ende erfolgte die Exposition auf einem Röntgenfilm (Kodak).

### 2.7.2 Nachweis der Expression von Bcl-2 mit der Durchflußzytometrie

Frisch isolierte oder 24 h in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Interleukin-8 kultivierte neutrophile Granulozyten wurden gewaschen (PBS/1% BSA) und in 4% Paraformaldehyd für 20 min fixiert. 1x10<sup>6</sup> Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen transferiert und in 1 ml eiskaltem PBS/1% BSA gewaschen. Danach erfolgten die Resuspension der Zellen in 100 µl Permeabilisierungspuffer (PBS/1% BSA/0,2% Saponin) und die Zugabe von monoklonalem Maus-Antikörper gegen Bcl-2 (4,3 µg/ml, IgG1κ) oder derselben Menge eines Kontroll-Antikörpers vom entsprechenden Isotypen. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis wurden die Zellen erneut gewaschen und in 100 µl PBS/1% BSA, dem 10 µl FITC-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Antikörper zugesetzt waren, erneut für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in PBS/1% BSA gewaschen und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Dazu wurden im Programm LysisII/Acquisition (Becton Dickinson) pro Probe 10.000 Ereignisse acquiriert und gespeichert. Die Auswertung erfolgte mit der Software LysisII/Analysis.

### 2.7.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse zur Identifizierung von Substraten der Tyrosin-Phosphorylierung

2,5x10<sup>6</sup> neutrophile Granulozyten wurden in 12-Loch-Zellkulturplatten in Abwesenheit oder Anwesenheit von 20 ng/ml TNFα für 60 min kultiviert. Die Platten wurden zuvor entweder mit PolyHema oder mit Fibronectin, wie bereits beschrieben, beschichtet. Das Assayvolumen betrug 500 µl und enthielt 0,2 mM Natrium Orthovanadat. Die Proben wurden geerntet und einmal in EP-Puffer (25 mM Tris/HCL pH 7,1, 50 mM KCL, 3 mM EDTA, 2,9 mM Benzamidin, 2,1 µM Leupeptin) gewaschen. 5x10<sup>6</sup> Zellen wurden in 26,6 µl EP-Puffer, der ein Inhibitor-Gemisch (Aprotinin 10 µg/ml, 0,1 mM Quercetin, 5 mM Jodoacetamid, 1mM PMSF, 0,2 mM Sodium orthovanadate) enthielt, resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in 9 M Urea lysiert, bevor 70 mM 1,4

Dithiothreitol (DTT) und 2% (v/v) Trägerampholyte zugegeben wurden. Die Suspension wurde für 5-10 min gut gemischt, zentrifugiert (20 min, 70.000 U/min bei RT), und der Proteingehalt des klaren Überstandes wurde bestimmt. Dieser Überstand wurde bei -70°C gelagert und in der 2D-GE aufgetrennt. In einem ersten Schritt wurden 100 µg Protein für die isoelektrische Fokussierung eingesetzt (IEF). Dazu wurden 6,5 x 8,5 x 0,15 cm große IEF-Gele nach der Methode von Klose et al. (Klose und Kobalz, 1995) verwendet. Die Gele enthielten 3,5 % Acrylamid, 0,3% Piperazin Diacrylamid und 4 % (v/v) Trägerampholyt-Mix. Während der Elektrophorese wurden die Proteine mittels pH-Gradienten (pH 3,5 - 9; durch Trägerampholyte während des Laufes eingestellt) entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (IP) getrennt. Nach dem Lauf wurden die Gele mittels Polypropylenfäden ausgestoßen und nachfolgend in Inkubationspuffer (125 mM Tris-Puffer, 40 % (v/v) Glycerol, 65 mM DTT, 3 % (w/v) SDS) auf die Bedingungen der SDS-PAGE eingestellt. Das IEF-Gel wurde auf die SDS-Polyacrylamid-Gele (15 % SDS, 0,2% Bis) transferiert. Die in der ersten Dimension nach IP getrennten Proteine wurden in der zweiten Dimension nach den Molekulargewichten getrennt (205 kDa bis 8,2 kDa). Die Bedingungen für die erste Dimension waren: 75 min 100 V, 75 min 200 V, 75 min 400 V, 75 min 600 V, 10 min 1000 V, 5 min 1000 V und für die zweite Dimension: 5 min 35 V, 10 min 55 V, 15 min 100 V, 60 min 150 V. Das Gel wurde entweder für präoperative Zwecke mit Coomassie Blau gefärbt (Eckerskorn et al., 1988) oder auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Transfer erfolgte innerhalb von 60 min mit einer Stromstärke von 2,5 mA/cm<sup>2</sup>. Die Membran wurde über Nacht in 5% Magermilch/TBS-T bei 4° C geblockt, in TBS-T gewaschen (40 min mit 4-maligem Wechsel der Waschlösung) und anschließend mit PY 20, einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen Phosphotyrosin (1: 2000 in 1%BSA/TBS-T verdünnt), für 3 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde in TBS-T für 40 min gewaschen (4-maliger Wechsel der Waschlösung) und mit dem sekundären Antikörper, einem Peroxidase-gekoppelten Ziegen-Antikörper gegen Maus-Ig (1:1000 in 1% BSA/TBS-T verdünnt), für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgten die Entwicklung mit dem ECL-System und die Exposition auf einem Kodak-Röntgenfilm.

#### 2.7.4 Immunzytochemie zur Lokalisation der Tyrosin-Phosphorylierung

Mit der konfokalen Mikroskopie wurden die Effekte von extrazellulären Matrixsubstanzen auf die Verteilung von phosphorylierten Proteinen innerhalb von TNF $\alpha$ -behandelten neutrophilen Granulozyten analysiert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen, die auf Matrix adhärert hatten, wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit 80% Methanol bei -20° C permeabilisiert. Da TNF $\alpha$ -behandelte Zellen nicht auf PolyHema haften, wurden diese Zellen abpipettiert, in Suspension fixiert und permeabilisiert. Nach 60 Minuten Inkubation in 1% BSA in PBS (BSA/PBS) wurden die Proben mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (Klon 1G2, 1:80) inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert (FITC-konjugierter Anti-Maus-IgG 1:100 in 1% BSA/PBS). Parallel dazu erfolgten die Kontrollfärbungen ohne den primären Antikörper. Das Präparat wurde dann mit einem Nikon-Diaphot Mikroskop unter Zuhilfenahme des konfokalen Imaging Systems Biorad MRC 600 analysiert, welches mit einem Argon-Krypton Laser (488/568 nm) ausgestattet war. Subzelluläre Lokalisationsstudien erfolgten mit einer sog. Schlüsselloch-Einstellung, wodurch eine



z-Auflösung von 0,5 mm möglich wurde. Z-Projektionen wurden anschließend mit Hilfe der som/thru View Software (BioRad) berechnet. Wenigstens 30 Zellen von jedem der 3 unabhängigen Experimente wurden durch 2 verschiedene Untersucher ausgewertet. Die Quantifizierung der Signal-Intensitäten erfolgte mittels der Histogramm/Fläche-Funktion der MRC-Cosmos Software. Die Zellen wurden dazu manuell umrandet und die errechnete mittlere Fluoreszenz-Intensität wurde bestimmt. Die Daten sind als Ratio der mittleren Fluoreszenzintensität der untersuchten Flächen zur mittleren Fluoreszenz-Intensität der Gesamtfläche ausgedrückt.

## **2.8 Analyse der mRNA-Expression durch RT-PCR**

### **2.8.1 Extraktion der RNA**

Die RNA wurde mit RNA-STAT bzw. Trizol entsprechend der vom Hersteller empfohlenen Anleitung aufgereinigt. Dazu wurden  $5 \times 10^6$  neutrophile Granulozyten oder Kontrollzellen in PBS gewaschen, in 1 ml der Lysierlösung resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die Mischung aus Zellen und RNA-STAT wurde anschließend mit 200 µl Chloroform extrahiert. Die RNA-Präzipitation erfolgte in 500 µl Isopropanol. Die so gewonnene RNA wurde in 1 mM EDTA, pH 8,0, aufgenommen und die Konzentration wurde über die Extinktionsmessung bestimmt.

### **2.8.2 Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der RNA**

Konzentration und Reinheit der RNA wurden durch die photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm und 280 nm bestimmt. Da ein OD bei 260 nm einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht, konnte die Konzentration der präparierten RNA mit Hilfe dieses Verhältnisses berechnet werden. Desweiteren bestimmten wir das Absorptions-Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$ , welches idealerweise 1,8 betragen sollte. Abweichungen zeigen Verunreinigung durch Proteine oder Phenole an.

### **2.8.3 Durchführung der RT-PCR**

Gen-spezifische RNA wurde mittels RT-PCR, basierend auf dem Protokoll des RNA-PCR-Kits von Clontech, analysiert. 1 µg Gesamt-RNA wurde durch die reverse Transkriptase in c-DNA umgeschrieben und anschließend mit Hilfe genspezifischer Primer amplifiziert. Dazu wurden 5 µl c-DNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt und unter folgenden Bedingungen mit 30 Zyklen in einem GeneAmp PCR System 9600 durch die PCR amplifiziert: 95°C für 45 sec, 58°C für 1 min und 72°C für 2 min. Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3PDH)-Primer wurden als interne Kontrolle verwendet. Die Primer für die PCR wurden in einem Primer-Auswahlprogramm selektioniert (MacVector, Kodak). Eine Kontrollreaktion ohne Zusatz von reverser Transkriptase wurde für jede RNA-Präparation durchgeführt, um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA zu erfassen.

Wir verwendeten folgende Primer-Paare: Vorwärtsprimer für die Mn-Superoxiddismutase (Mn-SOD) CGCCCTGGAACCTCACATCAAC und für Bcl-2 GCCTTCTTTGAGTTCGGTGGG; Rückwärtsprimer für die Mn-SOD CCCACACATCAATCCCCAGCAG und für Bcl-2 GAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCCAG. Die Primer wurden unter Benutzung eines Synthetisierers (Applied Biosystems Model 394 DNA synthesizer) hergestellt.

#### 2.8.4 Gelelektrophorese

10 µl PCR-Produkt/Bahn wurden auf ein 1,5 % Agarose-Gel, welches 0,5 µg/ml Ethidium Bromid enthielt, aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in TBE Puffer bei 80 V für 1 Stunde. Die Gele wurden unter UV-Licht mit einer Computerkamera fotografiert und auf Diskette gespeichert. In den Experimenten zur Expression der Mn-SOD mRNA erfolgte die Bestimmung der Ratio von G3PDH/Mn-SOD zu jedem der angegebenen Untersuchungszeitpunkte. Hierzu wurde das NIH-Image Programm verwendet. Der 0 Stunden-Wert wurde dabei als 100% gesetzt.

### 2.9 Charakterisierung von differentiell exprimierten Proteinen bei der Apoptose neutrophiler Granulozyten

#### 2.9.1 Separation nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen durch Sortierung mit Antikörper-beladenen magnetischen Teilchen

##### Herstellung einer hochreinen Präparation von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden von gesunden Spendern, wie weiter oben ausführlich beschrieben, durch Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Mit dieser Methode erhält man eine Präparation mit einem Anteil von etwa 95% neutrophilen Granulozyten und etwa 5% kontaminierenden eosinophilen Granulozyten. Für unsere Untersuchungen war es wichtig, diese kontaminierenden Zellen zu eliminieren, um eine möglichst reine Population neutrophiler Granulozyten analysieren zu können. Zur Entfernung der eosinophilen Granulozyten benutzten wir einen Antikörper, der das Oberflächenmolekül CD9 erkennt, welches nur auf eosinophilen, nicht aber auf neutrophilen Granulozyten vorkommt. Dazu wurden  $1 \times 10^7$  mit Histopaque und hypotoner Erythrozytenlyse isolierte Zellen mit 10 µg des anti-CD9 Antikörpers in 1 ml RPMI 1640/1% FCS für 25 min auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen in RPMI 1640 wurden die Zellen in 1 ml RPMI 1640/1% FCS resuspendiert, welches  $7,5 \times 10^6$  magnetische Teilchen (Dynabeads M-450 RAM) enthielt. Die beads sind über einen DNA-Linker an einen Ratten-Antikörper mit Spezifität gegen Maus-IgG1 gekoppelt, der nun mit dem murinen monoklonalen Antikörper gegen CD9 reagiert. Unter der Annahme einer etwa 5%igen Kontamination mit Eosinophilen wählten wir eine beads-zu-Zielzell Ratio von 10:1. Die beads wurden 2x in PBS/0,1% BSA gewaschen und für 15 min bei 4°C mit den Zellen, die zuvor mit dem anti-CD9-Antikörper behandelt waren, auf einem Rotator inkubiert. Mit Hilfe eines Magneten (magnetic particle concentrators, MPC) wurden die CD9-positiven eosinophilen Granulozyten anschließend entfernt. Die verbliebenen neutrophilen Granulozyten wurden 3x gewaschen und eventuell verbliebene Teilchen durch die erneute Anwendung des MPC restlos entfernt. Die Reinheit der negativ selektierten neutrophilen Granulozyten und der positiv selektierten eosinophilen Granulozyten wurde mittels Wright-Giemsa Färbung und lichtmikroskopischer Untersuchung bestätigt. Die so gewonnene hoch gereinigte Präparation von neutrophilen Granulozyten stand für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

##### Separation nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen

Im Anschluß an das CD9-Sorting wurden die hoch gereinigten neutrophilen Granulozyten für 24 h in RPMI 1640 mit 10% FCS inkubiert. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen in der

Gesamtpopulation betrug nach 24 h zwischen 30 und 50%. Für die Charakterisierung von Proteinen, die für das Überleben bzw. für die Apoptose bedeutsam sind, war es wichtig, eine Separation der apoptotischen und der nicht-apoptotischen Population zu erreichen. Verwendet wurde dazu erneut die Technik der Zellseparation mit magnetischen Teilchen. Die Grundlage bildete hierbei die Veränderung der Membranexpression des FcγIII-Rezeptors (CD16) während der spontanen Apoptose. Bei dem FcγIII-Rezeptor handelt es sich um einen extrazellulären Rezeptor, der über Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI) an die äußere Zellmembran von neutrophilen Granulozyten gekoppelt ist. Während nicht-apoptotische neutrophile Granulozyten eine hohe Expression dieses Rezeptors aufweisen, wird das CD16-Molekül während der spontanen Apoptose durch proteolytische Spaltung von der Oberfläche der Zellen depletiert. Die Analyse der CD16-Expression erlaubt somit eine zuverlässige Diskriminierung beider Populationen (Dransfield, 1994; Homburg, 1995). Wir verwendeten das CELlection-Kit von Dynal, um apoptotische und nicht-apoptotische Zellen zu separieren und folgten dabei dem empfohlenen Protokoll des Herstellers. Ein monoklonaler Antikörper gegen den FcγIII-Rezeptor (anti-CD16) wurde an die magnetischen Teilchen, die über einen DNA-Linker mit einem Ratten anti-Maus Antikörper beladen waren, gekoppelt. Dazu wurden  $1,3 \times 10^9$  beads in 1 ml PBS/0,1% BSA resuspendiert und mit 4 µg anti-CD16 pro  $1 \times 10^7$  beads konjugiert. Durch die Inkubation dieses magnetischen Konstruktes mit den Zellen und der anschließenden Anwendung des magnetischen Teilchen-Konzentrators (MPC) konnten die CD16-negativen apoptotischen Zellen von den CD16-positiven nicht-apoptotischen Zellen getrennt werden. Beide Subpopulationen wurden anschließend mittels Wright-Giemsa-Färbung und Lichtmikroskopie sowie mittels Annexin V-Färbung und Durchflußzytometrie charakterisiert.

### 2.9.2 Zweidimensionale hochauflösende Gelelektrophorese

Die Proteingemische aus Lysaten hoch aufgereinigter frisch isolierter neutrophiler Granulozyten sowie für 24 h kultivierter nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen wurden in der zweidimensionalen hochauflösenden Gelelektrophorese (2D-GE) analysiert. Nicht-apoptotische und apoptotische Zellpopulationen wurden zuvor durch magnetisches Zell-Sorting, wie weiter oben beschrieben, separiert. Anhand der Proteinmuster im Gel wurde die Expression von Proteinen in apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen mit denen der frisch isolierten neutrophilen Granulozyten verglichen. Aus präparativen Gelen wurden dann interessierende Proteine mit differentieller Expression durch Sequenzanalyse identifiziert.

In der ersten Dimension wurden die Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung nach ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt (IP) und in der zweiten Dimension, der Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page), nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Zur Probenaufbereitung wurden die isolierten neutrophilen Granulozyten in einem Proteaseinhibitor-Mix (Aprotinin 10 µg/ml, 0,1 mM Quercetin, 5 mM Jodoacetamid, 1 mM PMSF) in Suspension gebracht, mit 9 M Harnstoff (Biorad), 2 % (v/v) Trägerampholyten (40 %ig, pH 2-4) und mit 70 mM 1,4-Dithiothreitol versetzt. Die extrahierten Proteine wurden mittels Ultrazentrifugation bei 70.000 U/min für 20 min bei 20°C von den Zellfragmenten getrennt. Danach wurde die isoelektrische

Fokussierung durchgeführt (IEF). Dazu wurden die IEF-Gele (3,5 % Acrylamid, 9 M Harnstoff, 4 % (v/v) Trägerampholyt-Mix) in 23,5 cm langen zylindrischen Glasröhrchen (0,9 mm für analytische Gele und 1,5 mm für präparative Gele) gegossen. Während der Elektrophorese wurden die Proteine mittels pH-Gradienten (pH 3,5 - 9, durch Trägerampholyte während des Laufes eingestellt) entsprechend ihres isoelektrischen Punktes getrennt. Nach dem Lauf wurden die Gele mittels Polypropylenfäden ausgestoßen und in Inkubationspuffer (125 mM Tris-Puffer, 40 % (v/v) Glycerol, 65 mM DTT, 3 % (w/v) SDS) auf die Bedingungen der nachfolgenden SDS-PAGE eingestellt. Das IEF-Gel wurde auf die SDS-Polyacrylamid-Gele (15 %) transferiert. Die in der ersten Dimension nach IP getrennten Proteine wurden in der zweiten Dimension nach den Molekulargewichten (205 kDa bis 8,2 kDa) aufgetrennt. Analytische Gele wurden mittels Silberfärbung und präparative Gele mittels Coomassie Brilliant-Blue-Färbung entwickelt.

### 2.9.3 Enzymatischer *in-gel*-Verdau, Extraktion und Entsalzung der Proteine

Für die Identifizierung der interessierenden Proteine wurden die entsprechenden Proteinspots von bis zu 5 Coomassie-gefärbten Gelen mit einem Skalpel ausgeschnitten und für die enzymatische Aufspaltung kombiniert. Der enzymatische *in-gel* -Verdau wurde mit Trypsin durchgeführt. Die Extraktion der Peptide aus dem Gel mit nachfolgender Entsalzung erfolgte nach der Methode von Otto et al. (Otto, 1996). Dazu wurde die enzymatische Aufspaltung durch den Zusatz von 100 mM Tris HCl-Puffer, 1 mM CaCl<sub>2</sub> plus 1/4 µg Trypsin pro ausgeschnittenem Spot in Gang gesetzt. Der Verdau erfolgte für 15 h bei 36 °C. Die Peptid-Lösungen wurden anschließend konzentriert.

### 2.9.4 Reverse HPLC und Sequenzierung durch Edman-Degradation

Die Peptid-Gemische wurden mit Hilfe eines HPLC-Systems und einer C2/C18-Säule separiert. Die Separation erfolgte an einer Säule mit einem 2,1 mm Innendurchmesser und einer Länge von 10 cm. Ein linear ansteigender Gradient von Acrylnitril in 0,1% (v/v) TFA wurde bei einer Flußrate von 100 µl/min bei RT eingesetzt. Die Peptid-Fractionen wurden anschließend in einem Speed-Vac Gerät konzentriert und auf Biobren-beschichtete Filter aufgebracht. Diese Filter wurden in einem Sequencer mit einem PTH-Aminosäure-Analyse-Gerät (Perkin Elmer/Applied Biosystems) analysiert.

### 2.9.5 Peptid-Sequenzierung durch MALDI-MS (Matrix assisted laser desorption/ionization)

Der konzentrierte Proteinextrakt, der durch den *in-gel*-Trypsin-Verdau gewonnen wurde, wurde in 5 µl einer Acetonitrile-Wasser-Lösung (1:1), die 5% (v/v) Ameisensäure enthält, aufgenommen. MALDI-MS wurde mit einem VG TOF SPEC (Fisons, Manchester, UK, Bruker, Bruker Reflex, Bruker Franzen, Bremen), das mit einem Stickstoff-Laser ausgestattet war, durchgeführt. Die Massenspektren wurden als Summation von 20 - 50 Laser-Applikationen aufgenommen. Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung von α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% Acetonitrile-Wasser-Lösung und 0,1 % TFA (v/v) verwendet. Die Messungen erfolgten in einem 24 kV Vakuum.

### 2.9.6 Peptid-Sequenzierung durch Nanoelektrospray-Massen-Spektrometrie

Diese Peptid-Lösung wurde mittels Nanoelectrospray-Massen-Spektrometrie in einem Q-ToF (Micromass, Manchester, UK) analysiert, der mit einer Z-Spray-Ionenquelle ausgestattet war. Ein  $\mu\text{l}$  der zu analysierenden Lösung wurde dazu in die Nanospray-Borsilikat-Glaskapillare (Micromass, Manchester, UK) pipettiert, in das Massen-Spektrometer mit einer Flußrate von 20-40  $\text{nl min}^{-1}$  infundiert und mittels eines sog. time of flight (TOF) Analyzers bestimmt. Die Tandem-Massen-Spektrometrie (MS/MS) wurde verwendet, um die Spektren von 5-6 ausgewählten Peptiden zu bestimmen.

### 2.9.7 Datenbankvergleiche

Die Proteine wurden durch das sog. Peptide-Mass-Fingerprinting (PMF) identifiziert. Die durch MALDI-MS erhaltenen Massen-Karten wurden mit Hilfe des Programms MS-FIT von Clauser und Baker (UCSF Massen Spektrometrie Einrichtung, San Francisco, CA, USA) bearbeitet und mit den theoretischen Peptid-Massen von bekannten Proteinen aus der SWISSPROT Datenbank verglichen. Die mit der Tandem-Massen-Spektrometrie bestimmten Aminosäure-Sequenzen wurden mit den bekannten Aminosäure-Sequenzen der identifizierten Proteine verglichen, um die Richtigkeit der Ergebnisse zu bestätigen.

## 2.10 Auswertungen

Die statistischen Analysen wurden auf einem Macintosh Computer (Apple Inc., Cupertino, CA, USA) durchgeführt. Der Computer war mit kommerziell verfügbaren Programmen ausgestattet (Statview, Cricket Software Inc., Philadelphia, PA, USA). Der nicht-parametrische Wilcoxon Rank-Test wurde verwendet, um zu testen, ob Verteilungsunterschiede zwischen Gruppen bestehen und ob diese ungleich 0 waren. In einigen Untersuchungen wurde zum Vergleich zwischen gepaarten Datengruppen der gepaarte Studentische-T-Test eingesetzt. Für multiple Vergleiche wurde die ANOVA Berechnung verwendet. Da einige Daten wiederholte Messungen und multiple Testungen beinhalteten, wurde ein allgemeines lineares Modell mit 2 verschiedenen Kulturoberflächen (Fibronektin und PolyHema) und 2 verschiedenen Inhibitoren (DEVD and YVAD) mit ansteigenden Konzentrationen (1, 10, 25, and 100  $\mu\text{M}$ ) zur Berechnung verwendet. Dabei wurden sowohl die Signifikanz der experimentellen Veränderungen als auch ihre Interaktionen getestet. Im Falle signifikanter Interaktionen wurden Submodelle mit dem post-hoc Scheffe-Test analysiert. Hierdurch wurde multiples Testen erlaubt. Für diese Berechnungen wurde das Statistik-Programm SPSS (SPSS Inc., Chicago, Ill.) verwendet. Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SEM ausgedrückt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war.

### 3 Ergebnisse

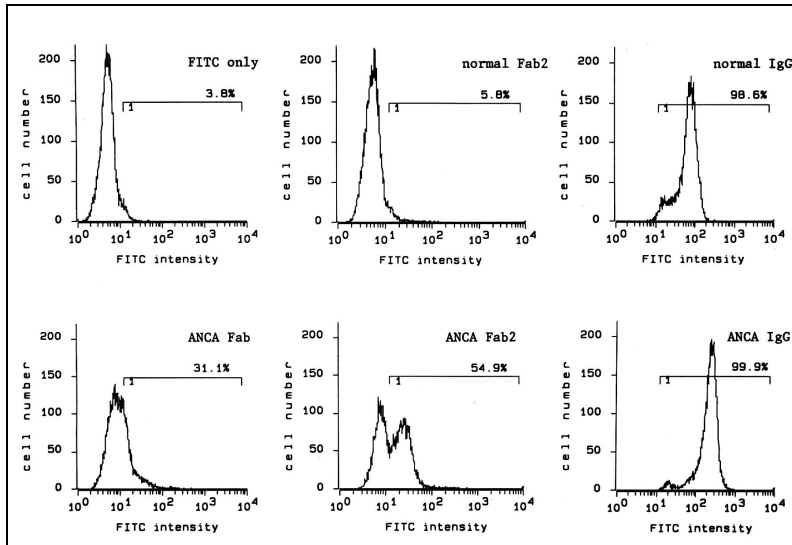
#### 3.1 Mechanismen der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA

Humane ANCA und monoklonale Antikörper gegen menschliche PR3 bzw. MPO können  $\text{TNF}\alpha$ -geprimte neutrophile Granulozyten aktivieren. Diese aktivierten Granulozyten generieren toxische Sauerstoffradikale. Um zugrundeliegende Mechanismen, die für die Auslösung dieser Aktivierung essentiell sind, zu untersuchen, wurden intakte Antikörper und deren korrespondierende  $\text{F(ab')}_2$ - und Fab-Fragmente präpariert. Diese Präparationen wurden in Bindungsstudien und Aktivierungsassays getestet, wobei ANCA-IgG von jeweils zwei Patienten mit PR3-ANCA bzw. MPO-ANCA und ein monoklonaler Antikörper gegen menschliche PR3 verwendet wurde. In zusätzlichen Untersuchungen wurde die Rolle des  $\text{Fc}\gamma\text{IIa}$ -Rezeptors charakterisiert.

##### 3.1.1 Bindungsverhalten von ANCA und den korrespondierenden $\text{F(ab')}_2$ - und Fab-Fragmenten

ANCA müssen, um neutrophile Granulozyten aktivieren zu können, an deren Zelloberfläche binden. Deshalb wurden zunächst die Bindungseigenschaften von intakten humanen ANCA und deren Fragmenten mittels Durchflußzytometrie untersucht (Abbildung 4, Panel A). Dazu wurden die Antikörper mit Biotin markiert und mit FITC-konjugiertem Avidin gefärbt. In 3 unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, daß intakte humane ANCA und deren  $\text{F(ab')}_2$ - und Fab-Fragmente an der Oberfläche von  $\text{TNF}\alpha$ -geprimten neutrophilen Granulozyten binden. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit  $\text{F(ab')}_2$ - und Fab-Fragmenten demonstrieren, daß die Entfernung des Fc-Teiles zu einer verminderten Bindung führte. Im Vergleich der Bindungsintensitäten von  $\text{F(ab')}_2$ - und Fab-Fragmenten ließen sich keine Unterschiede erkennen. Im Gegensatz dazu zeigte sich, daß intaktes IgG von gesunden Kontroll-Personen, nicht aber die korrespondierenden  $\text{F(ab')}_2$ - und Fab-Fragmente an den Zellen binden. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß normales IgG via Fc-Fragment an  $\text{TNF}\alpha$ -behandelten neutrophilen Granulozyten bindet, während ANCA darüberhinaus über die Antigen-bindenden Domänen der Fab-Teile binden.

Panel A



Panel B

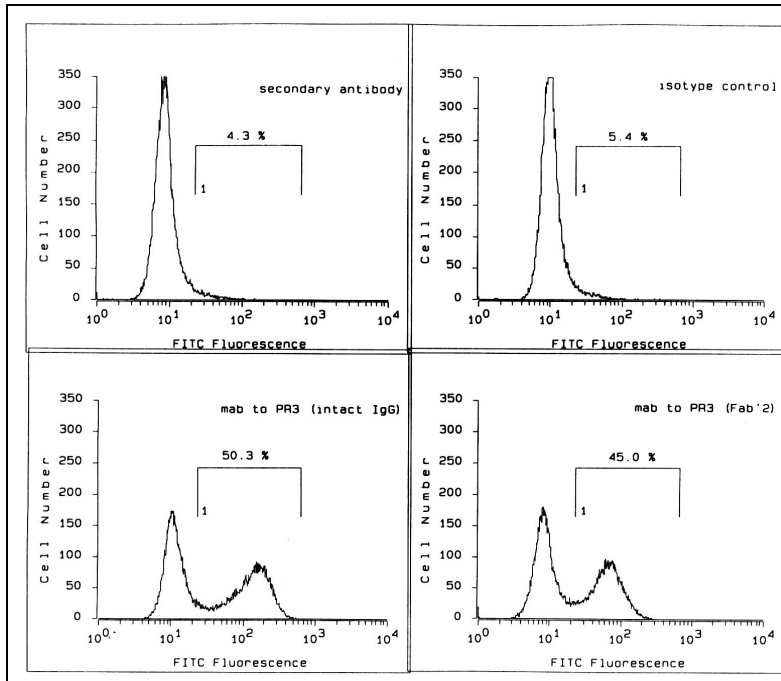


Abbildung 4: Mittels Durchflußzytometrie wurden die Bindungseigenschaften von biotinylierten humanen PR3-ANCA, PR3 F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmenten mit denen von entsprechenden Kontroll-Präparationen verglichen (Panel A). Das Bindungsverhalten des intakten monoklonalen Antikörpers gegen menschliche PR3 und seines korrespondierenden F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes sowie der monoklonalen Kontroll-Präparationen ist in Panel B gezeigt.

Anders stellte sich die Situation bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers gegen menschliche PR3 dar. Während eine Bindung des intakten Antikörpers und des F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes beobachtet wurde, zeigte der monoklonale Kontroll-Antikörper keine Bindung. Die Untersuchungen wurden ebenfalls mit der Durchflußzytometrie durchgeführt, wobei ein sekundärer FITC-markierter Antikörper verwendet wurde (Abbildung 4, Panel B).

### 3.1.2 Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA und die korrespondierenden F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmente

Nachdem das Bindungsverhalten der Antikörper und der Antikörper-Fragmente charakterisiert war, erfolgten Messungen zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Aufgereinigte Immunglobuline der Patienten K.M. und R.R. mit PR3-ANCA und der Patienten A.A. und T.R. mit MPO-ANCA sowie die korrespondierenden F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmente wurden verwendet, um die Superoxid-Produktion in Neutrophilen von gesunden Spendern zu stimulieren. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Superoxidgeneration der Zellen in Anwesenheit ( $3,4 \pm 1,83 \text{ nmol O}_2^- / 2,5 \times 10^6 \text{ PMN} / 45 \text{ min}$ ; n=34) und Abwesenheit ( $2,3 \pm 1,10 \text{ nmol O}_2^- / 2,5 \times 10^6 \text{ PMN} / 45 \text{ min}$ ; n=34) der Priming-Dosis von 1,3 ng/ml TNF $\alpha$  wurde in jedem Experiment gemessen, als 0-Wert gesetzt und von den Resultaten der ANCA-Stimulation abgezogen.



Tabelle 1: Superoxid-Produktion in  $\text{TNF}\alpha$ -behandelten neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit humanen ANCA, Maus-Antikörpern gegen humane PR3 und den jeweiligen korrespondierenden Antikörperfragmenten.

Stimulus	Intaktes Ig	Fab2 Fragment	Fab Fragment
PR3-ANCA (K.M.)	15,3 $\pm$ 7,39 (n=21) (p<0,01) <sup>1</sup>	10,2 $\pm$ 4,34 (n=9) (p<0,01) <sup>2</sup>	-1,4 $\pm$ 2,47 (n=4) (p<0,05) <sup>3</sup>
PR3-ANCA (R.R.)	8,4 $\pm$ 4,87 (n=6) (p<0,01) <sup>1</sup>	36,9 (n=1)	-0,6 $\pm$ 0,49 (n=5)
MPO-ANCA (A.A.)	10,2 $\pm$ 6,70 (n=9) (p<0,01) <sup>1</sup>	30,7 $\pm$ 7,04 (n=3) (p<0,05) <sup>2</sup>	-1,8 $\pm$ 3,67 (n=5) (p<0,05) <sup>3</sup>
MPO-ANCA (T.R.)	2,6 $\pm$ 3,57 (n=9) (n.s.) <sup>1</sup>	25,9 $\pm$ 4,04 (n=4) (p<0,01) <sup>2</sup>	-2,7 $\pm$ 1,54 (n=5) (p<0,05) <sup>3</sup>
Humane Kontrolle	1,0 $\pm$ 1,62 (n=9)	-0,7 $\pm$ 1,79 (n=7)	n.d.
Maus-PR3-ANCA	25,7 $\pm$ 8,55 (n=11) (p<0,01) <sup>1</sup>	-0,01 $\pm$ 1,31 (n=6)	n.d.
Kontroll IgG <sub>1</sub>	0,97 $\pm$ 0,59 (n=4)	n.d.	n.d.

125  $\mu\text{g/ml}$  humane Antikörper, 4  $\mu\text{g/ml}$  muriner anti-PR3 Antikörper und dieselbe Menge von korrespondierenden Antikörperfragmenten wurden getestet. Die  $\text{O}_2^-$ -Abgabe ( $\text{nmol O}_2^-/2,5 \times 10^6 \text{ PMN/30 min}$ ) wurde verglichen zwischen: **1**intakten ANCA und Kontroll-Antikörpern; **2**ANCA-Fab<sub>2</sub> and Kontroll-Fab<sub>2</sub>; **3**ANCA-Fab<sub>2</sub> und ANCA-Fab; n.d.=not done.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Resultate zeigen, daß intakte ANCA-Immunglobuline der verschiedenen Patienten eine unterschiedlich starke Aktivierung auslösten. Die durch die ANCA-Stimulation abgegebenen Mengen an Superoxid reichten von  $2,6 \pm 3,59 \text{ nmol O}_2^-/2,5 \times 10^6 \text{ PMN/30 min}$  (Patient T.R., n=9) bis zu  $15,3 \pm 7,39 \text{ nmol}$  (Patient K.M., n=21). Zur Kontrolle erfolgte die Inkubation mit Immunglobulinen gesunder Spender ( $1,0 \pm 1,62 \text{ nmol O}_2^-$ , n=9) oder mit 50 ng/ml PMA ( $44,8 \pm 2,53 \text{ nmol O}_2^-$ , n=16).

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß auch ANCA-F(ab')<sub>2</sub> eine signifikante  $\text{O}_2^-$ -Produktion initiierten, wohingegen F(ab')<sub>2</sub>-Präparationen von gesunden Kontrollen keine  $\text{O}_2^-$ -Generation bewirkten ( $1,0 \pm 1,62 \text{ nmol O}_2^-/2,5 \times 10^6 \text{ PMN/30 min}$ ). Interessanterweise konnte beobachtet werden, daß bei drei von vier Patienten die ANCA-F(ab')<sub>2</sub> stärkere Stimuli waren als die intakten ANCA-Ig. Zum Beispiel fand sich bei dem Patienten T.R., dessen intakte ANCA die geringsten  $\text{O}_2^-$ -Abgaben auslösten ( $2,6 \pm 3,57 \text{ nmol O}_2^-$ ), eine starke Superoxid-Freisetzung, wenn die F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente getestet wurden ( $25,9 \pm 4,04 \text{ nmol O}_2^-$ ). Es wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung mit intakten PR3-

ANCA and  $F(ab')_2$ -Fragmenten des Patienten R.R. (Abbildung 5) erstellt. Diese Untersuchungen zeigen, daß sowohl intakte ANCA als auch  $F(ab')_2$ -Fragmente eine Dosis-abhängige Aktivierung  $TNF\alpha$ -geprimter neutrophiler Granulozyten bewirken.

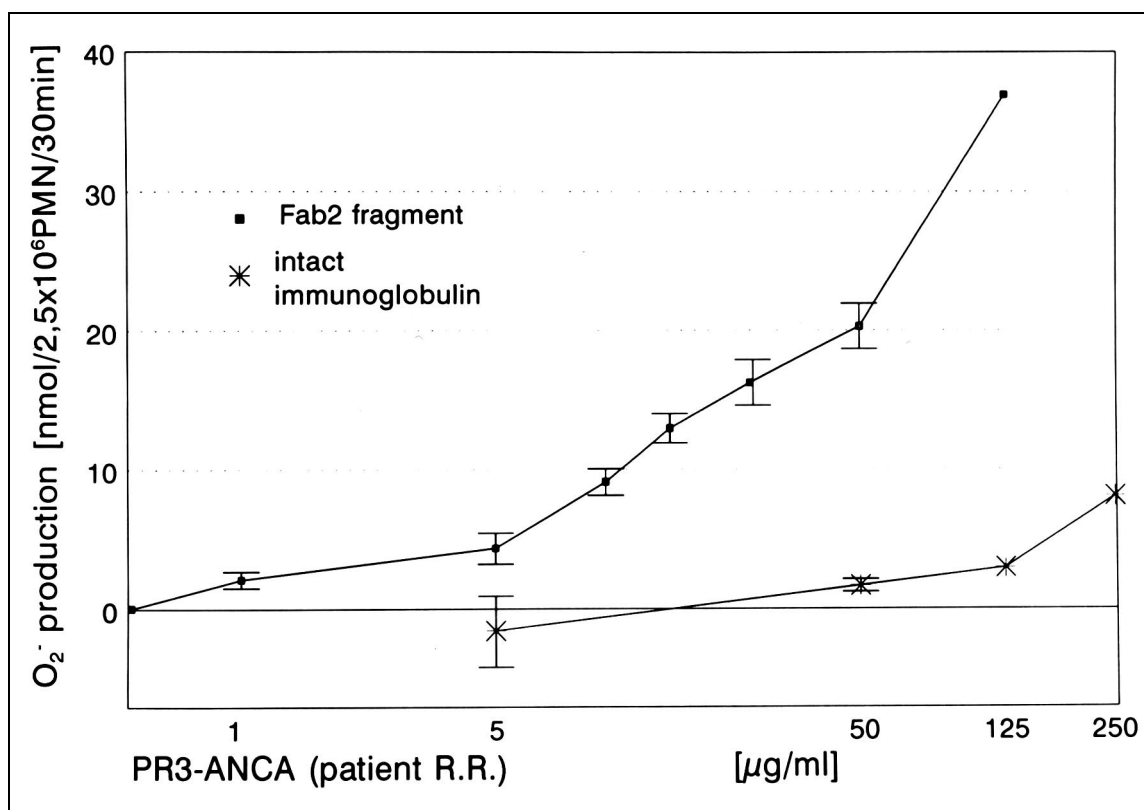


Abbildung 5:  $TNF\alpha$ -geprimte neutrophile Granulozyten wurden mit 5, 50, 125, und 250 µg/ml intakte PR3-ANCA und 0,5, 1, 5, 10, 15, 25, 50 und 125 µg/ml des korrespondierenden  $F(ab')_2$ -Fragmentes stimuliert. Die Superoxid-Produktion zeigt eine Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Im Gegensatz zu intakten ANCA und zu ANCA- $F(ab')_2$ -Fragmenten fand sich keine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, wenn ANCA-Fab eingesetzt wurden. Dieser Befund ließ sich für die Fab-Präparationen von allen vier Patienten erheben. Da die Stärke der Antwort auf die Antikörper-Stimuli zwischen verschiedenen Spender-Zellen variierte, wurden Experimente durchgeführt, bei denen intakte ANCA,  $F(ab')_2$ - und Fab-Fragmente simultan an derselben Zell-Präparation getestet wurden (Abbildung 6). Diese Experimente lassen unmittelbare Vergleiche zu und bestätigen, daß die abgegebenen  $O_2^-$ -Mengen nach Stimulation mit ANCA- $F(ab')_2$ -Fragmenten häufig höher war als mit intakten ANCA, während in keinem der Experimente eine Aktivierung durch ANCA-Fab zu beobachten war.

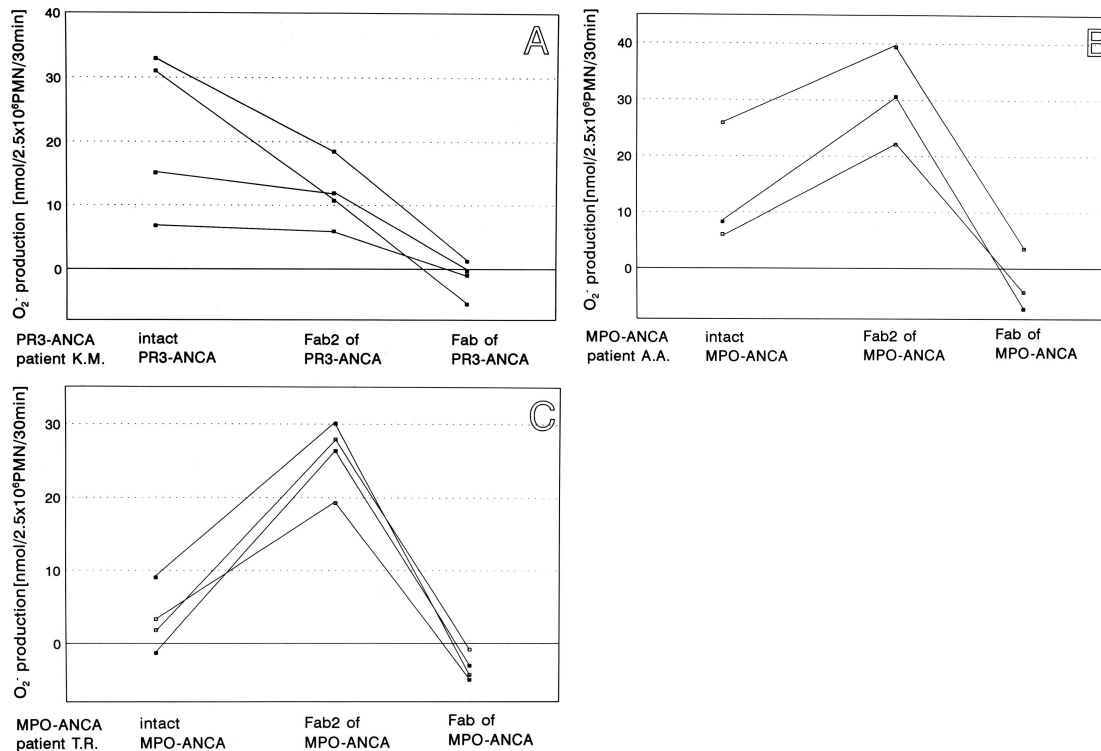


Abbildung 6: Der Effekt von intakten ANCA,  $F(ab')_2$ - und Fab-Fragmenten auf die Superoxidgeneration wurde parallel an  $TNF\alpha$ -geprimten neutrophilen Granulozyten derselben Präparation getestet. Die Zellen wurden mit 125  $\mu g/ml$  intakten ANCA oder den korrespondierenden Antikörper-Fragmenten stimuliert (Panel A-C).

Die bisherigen Ergebnisse demonstrieren, daß Fab-Fragmente ihre Ziel-Ag auf der Oberfläche der geprimten Zellen binden, ohne jedoch die Generation von Superoxid auszulösen. Es wurden daraufhin Untersuchungen durchgeführt, in denen die Fab-Fragmente nach ihrer Bindung an der Zelloberfläche mit zwei verschiedenen Methoden quervernetzt wurden (Abbildung 7). Zur Quervernetzung wurden entweder  $F(ab')_2$ -Fragmente eines Ziegen-Antikörpers, der gegen menschliche Immunglobuline gerichtet war, verwendet oder eine Biotinylierung der Fab-Fragmente mit nachfolgender Benutzung von Avidin. Wenn die Fab-Fragmente quervernetzt wurden, kam es in 18 der 19 Experimente zu einem Anstieg von generiertem Superoxid mit einer statistischen Signifikanz bei 3 der 4 Patienten.

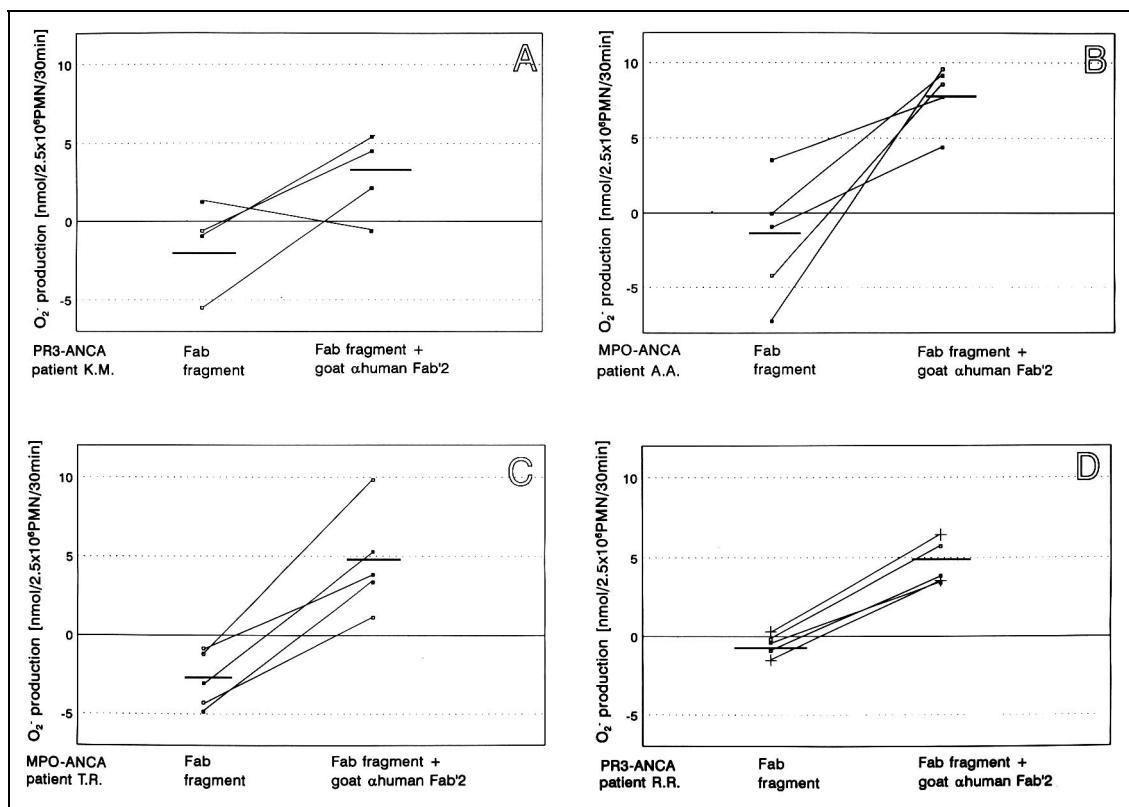


Abbildung 7: Dargestellt ist die Generation von Superoxid durch  $TNF\alpha$ -geprimte neutrophile Granulozyten, die mit 125  $\mu\text{g/ml}$  humanen ANCA-Fab-Fragmenten ohne oder mit nachfolgender Gabe von quervernetzenden  $F(ab')_2$ -Fragmenten eines Ziegen-Antikörpers gegen menschliche IgG- $F(ab')_2$  stimuliert wurden.

Bei einer Reihe von veröffentlichten Aktivierungsstudien wurden monoklonale Antikörper gegen menschliches PR3 oder MPO als Ersatz für humane ANCA verwendet. Es wurde überprüft, ob sich die Ergebnisse aus den dargestellten Untersuchungen mit humanen ANCA auf den Maus-Antikörper übertragen lassen, oder ob hinsichtlich der Aktivierung neutrophiler Granulozyten Unterschiede zwischen den polyklonalen humanen ANCA und den monoklonalen Maus-Antikörpern bestehen. Bei Verwendung eines intakten monoklonalen Antikörpers gegen humane PR3 konnte eine Dosis-Wirkungsbeziehung für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden. 2  $\mu\text{g/ml}$  dieses Antikörpers führten zur Generation von  $18,18 \pm 8,1$  nmol  $O_2^-$  /2,5x10<sup>6</sup>PMN/30 min, während dieser Wert für 4  $\mu\text{g/ml}$   $22,08 \pm 3,4$  und für 15  $\mu\text{g/ml}$   $28,56 \pm 5,2$  betrug.

Es erfolgte die Präparation der korrespondierenden  $F(ab')_2$ -Fragmente sowie eine simultane Testung beider Moleküle im Superoxid-Assay an Zellen desselben Spenders (Abbildung 8). Im Gegensatz zum intakten monoklonalen Antikörper gegen humane PR3 bewirkte das  $F(ab')_2$ -Fragment bei keiner der verwendeten Konzentrationen eine signifikante Superoxidgeneration.

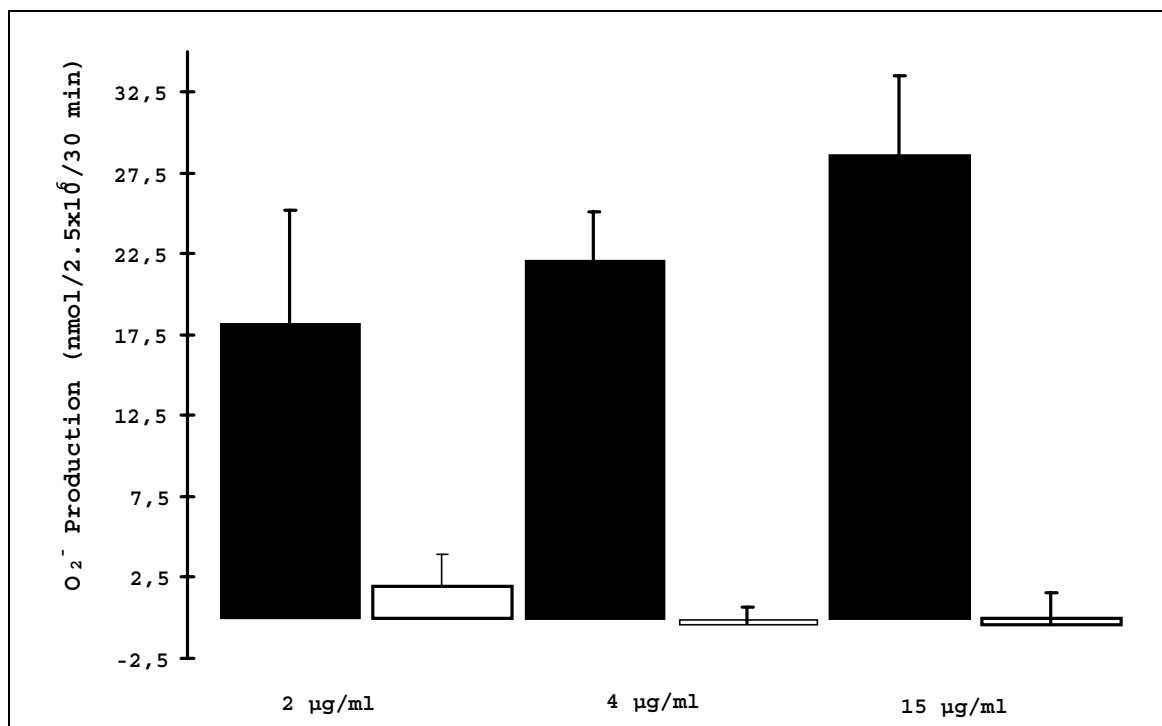


Abbildung 8: Der Effekt von intaktem monoklonalen Antikörper gegen menschliche Proteinase 3 (schwarze Säulen) und dem korrespondierenden F(ab')<sub>2</sub>-Fragment (offene Säulen) auf die Superoxidproduktion TNF $\alpha$ -geprimter neutrophiler Granulozyten. Es besteht eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für den intakten monoklonalen Antikörper, während die F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente bei keiner der eingesetzten Konzentrationen eine Aktivierung auslösten (n=5).

Die durchflußzytometrischen Studien hatten gezeigt, daß F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente des monoklonalen Antikörpers gegen humanes PR3 an TNF $\alpha$ -geprimte neutrophile Granulozyten binden. Das Ausmaß dieser Bindung war mit dem des intakten monoklonalen Antikörpers vergleichbar. Es wurde deshalb geprüft, ob eine Quervernetzung der gebundenen F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente zu einer Induktion der Superoxid-Produktion führt. Dazu wurden F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente eines Ziegen-Antikörpers verwendet, die gegen das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment von Maus-Antikörpern gerichtet sind. Diese Quervernetzung führte nicht zu einem Anstieg der Superoxidproduktion (Abbildung 9). Die abgegebenen Mengen an O<sub>2</sub><sup>-</sup> betrugen  $-0,1 \pm 1,27$  nmol/2,5x10<sup>6</sup>PMN/30 min, wenn F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente des monoklonalen Antikörpers gegen humane PR3 allein verwendet wurden und  $0,2 \pm 0,96$  nmol, wenn diese Fragmente quervernetzt wurden.

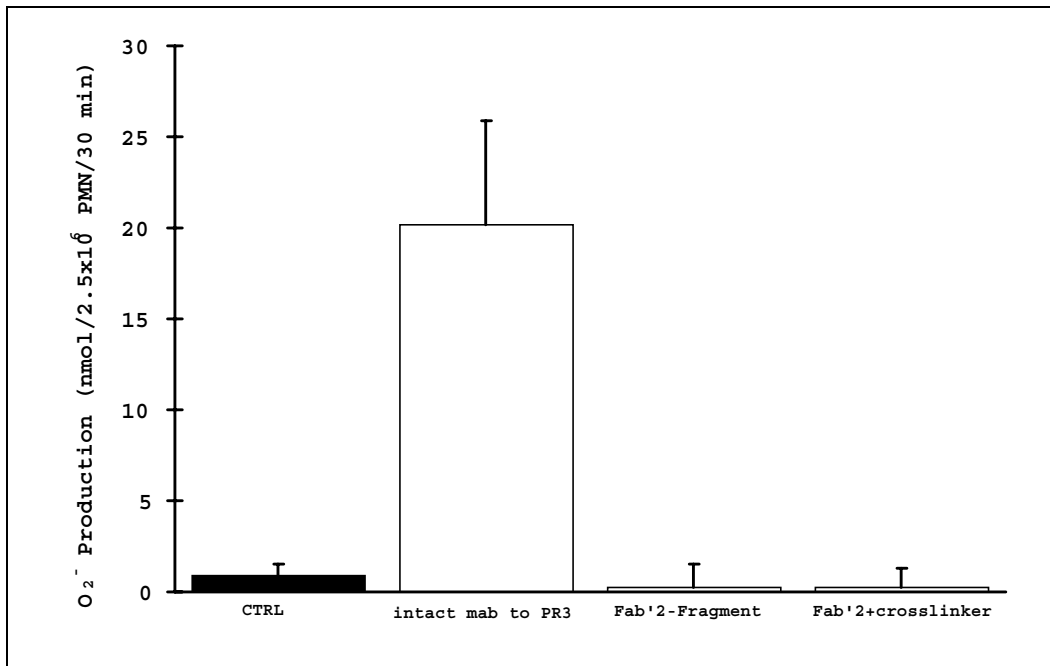


Abbildung 9: Die Quervernetzung von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten eines monoklonalen Maus-Antikörpers gegen humane PR3 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten führt nicht zur Generation von Superoxid.

### 3.1.3 Rolle des FcγIIa-Rezeptors bei der Aktivierung

Humane ANCA-Immunglobuline und monoklonale Antikörper gegen humane Proteinase 3 können mit den Fcγ-Rezeptoren, die von neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, interagieren. Auf diesen Zellen werden sowohl der FcγIIa-(CD32) als auch der FcγIII-Rezeptor (CD16) konstitutionell exprimiert. In der Literatur fanden sich Hinweise für eine Bedeutung des FcγIIa-Rezeptors bei der ANCA-vermittelten Aktivierung neutrophiler Granulozyten. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer Blockade dieser Rezeptoren auf die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch humane ANCA sowie durch den monoklonalen Maus-Antikörper gegen menschliche Proteinase 3 untersucht. Dazu wurden die Zellen während des TNFα-Primings mit einem blockierenden monoklonalen Antikörper gegen den FcγIIa-Rezeptor vorinkubiert und nachfolgend mit ANCA aktiviert. Zunächst wurde der Effekt des blockierenden Antikörpers auf die Superoxid-Produktion bestimmt. Die Inkubation TNFα-geprimter Granulozyten mit dem kompletten anti-Rezeptor-Antikörper bewirkte eine  $O_2^-$ -Generation von  $3,5 \pm 0,75$  nmol/2.5x10<sup>6</sup>PMN/30 min und von  $2,6 \pm 0,87$  nmol, wenn ein Fab-Fragment dieses Antikörpers verwendet wurde. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant, und für die weiteren Versuche wurde ein intakter anti-FcγIIa-Rezeptor-Antikörper eingesetzt. Ein Zeitverlauf der ANCA-vermittelten Superoxid-Generation mit und ohne Blockade des FcγIIa-Rezeptors (n=2) wurde erstellt. Beide Experimente demonstrierten einen inhibitorischen Effekt der Rezeptor-Blockade auf die Aktivierung. Diese Wirkung war bereits nach 5 min nachweisbar und ließ sich über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachten (Abbildung 10).

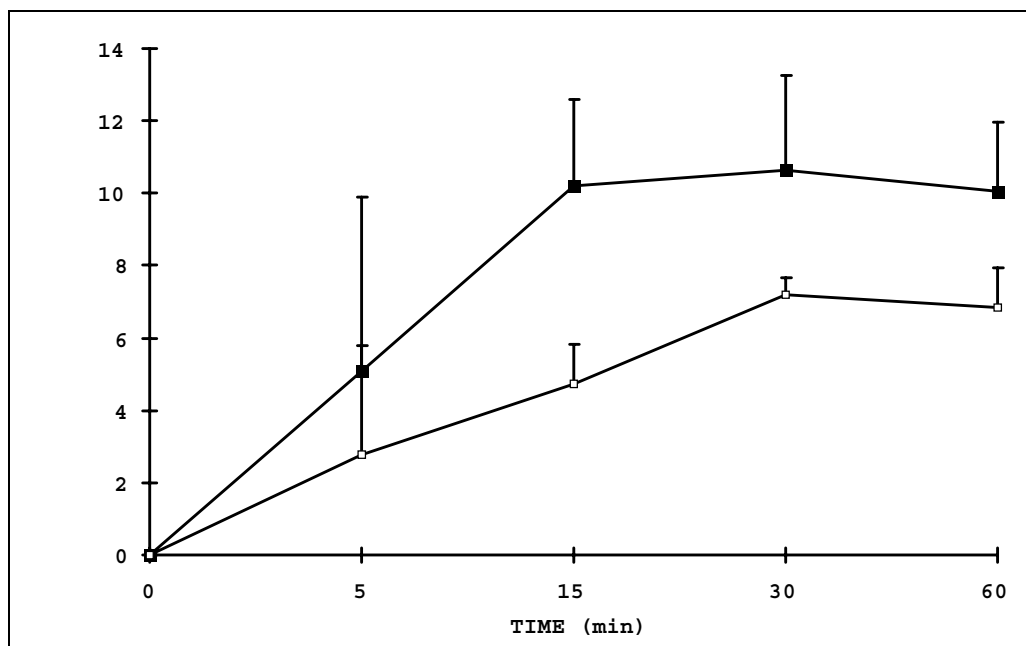


Abbildung 10: Die Blockade des Fc $\gamma$ IIa-Rezeptors mit dem Antikörper IV.3 hemmt die Freisetzung von Superoxid in TNF $\alpha$ -geprimten neutrophilen Granulozyten, die mit 125  $\mu$ g/ml PR3-ANCA (Pat K.M.) stimuliert wurden. Die Superoxid-Generation ohne (offene Symbole) und mit Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor-Blockade (geschlossene Symbole) wurde nach 5, 15, 30 und 60 min. bestimmt.

Basierend auf diesem Zeitverlauf wurde für die nachfolgenden Experimente der 30 min-Zeitpunkt ausgewählt. Die Rolle einer Blockade des Fc $\gamma$ IIa-Rezeptors bei der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch entweder humane ANCA (PR3-ANCA, Pat. K.M., n=7) oder durch den monoklonalen Maus-Antikörper gegen menschliche Proteinase 3 (n=5) wurde bestimmt. Die Generation von Superoxid wurde durch die Blockade des Fc $\gamma$ IIa-Rezeptors in jedem einzelnen der Experimente vermindert (Abbildung 11). Die Hemmung betrug bei der Stimulation mit humanen ANCA 33% ( $13,1 \pm 4,27$  nmol/ $2,5 \times 10^6$  PMN/30 min versus  $8,6 \pm 2,79$  nmol,  $p < 0,05$ ) und bei der Aktivierung mit dem monoklonalen anti-PR3-Antikörper 25% ( $23,5 \pm 11,03$  nmol versus  $17,64 \pm 10,81$  nmol, n.s.).

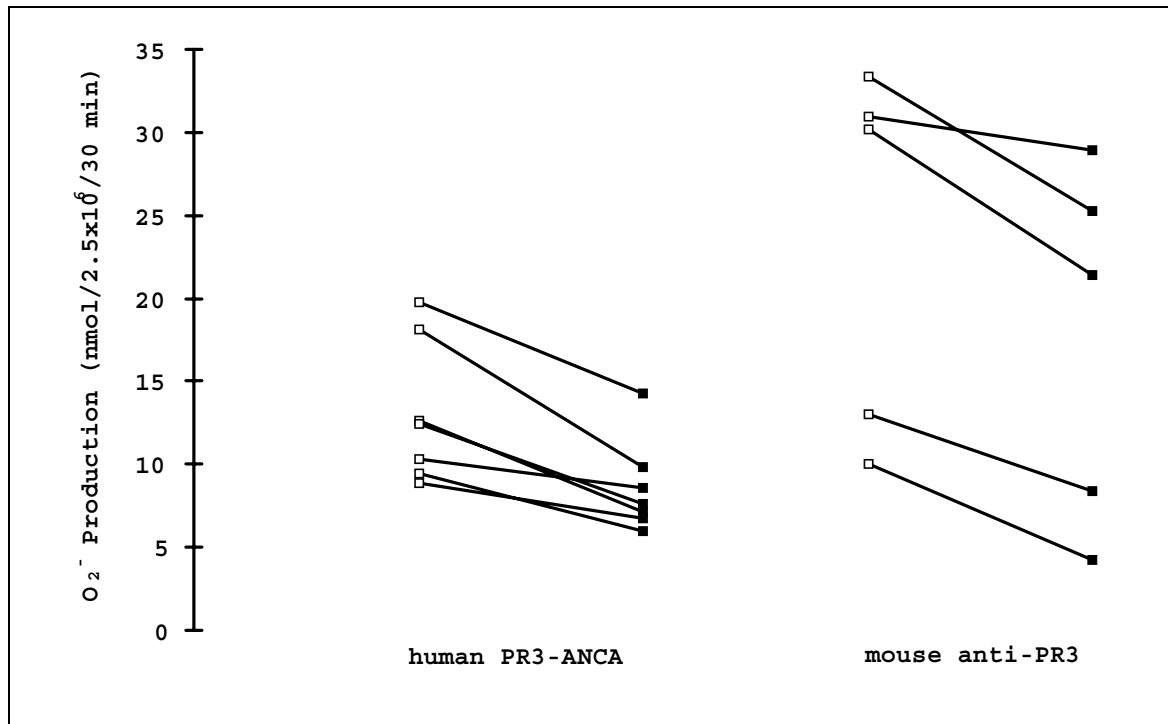


Abbildung 11: Die Blockade des Fcγ1a-Rezeptors bewirkte eine Inhibition der Superoxid-Freisetzung in TNFα-geprimten neutrophilen Granulozyten, die entweder mit humanen ANCA oder mit monoklonalem Antikörper gegen menschliche Proteinase 3 stimuliert wurden. Superoxid wurden in der Abwesenheit (offene Symbole) oder in der Anwesenheit (geschlossene Symbole) eines Fcγ1a-Rezeptor-blockierenden Antikörpers gemessen.

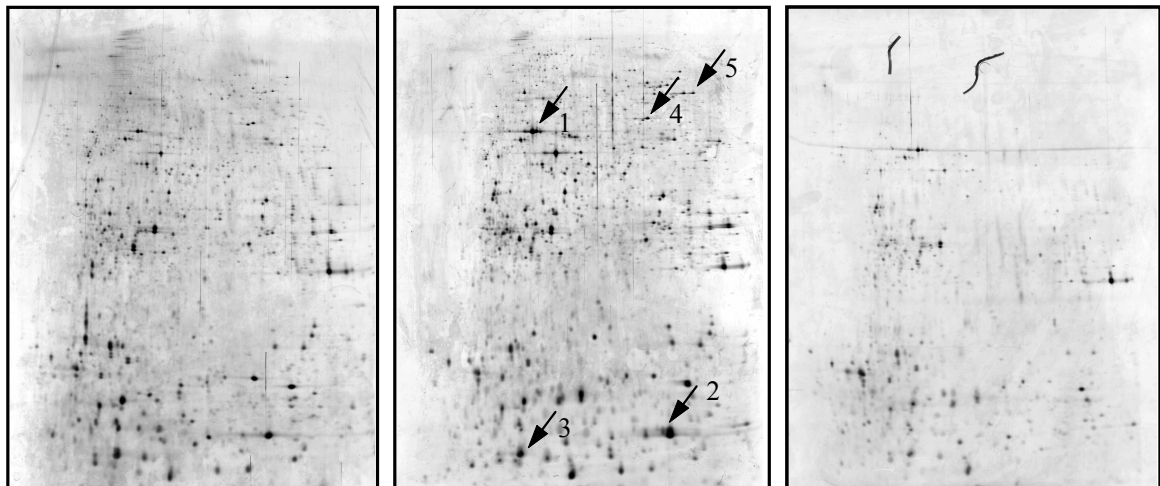


Abbildung 32: Zweidimensionale hochauflösende Gelelektrophoresen von humanen neutrophilen Granulozyten. Dargestellt sind die Proteinexpressionsmuster von frisch isolierten Zellen (links), 24 h kultivierten nicht-apoptotischen (Mitte) und apoptotischen Zellen (rechts). Die Entwicklung der Gele erfolgte durch Silberfärbung. Die Proteine, die sequenziert wurden, sind im mittleren Gel mit den Zahlen 1-5 numeriert.



Im visuellen Vergleich der hochauflösenden 2D-GE in Abbildung 32 fallen Proteinspots auf, deren Intensität zwischen den 3 Bedingungen nicht differiert. Es ist jedoch augenscheinlich, daß die Mehrzahl der Proteine in den apoptotischen Zellen geringer exprimiert ist. Von besonderem Interesse waren solche Proteine, die in allen 5 Experimenten in den nicht-apoptotischen Zellen im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen hochreguliert waren und deren Expression andererseits in der apoptotischen Population deutlich verringert war. Fünf solcher Proteine, die in Abbildung 32 mit den Nummern 1-5 bezeichnet sind, konnten identifiziert werden. Dazu wurden verschiedene Sequenzierungstechniken eingesetzt. Der Ablauf der Proteinsequenzierung ist im folgenden Schema dargestellt (Abbildung 33).

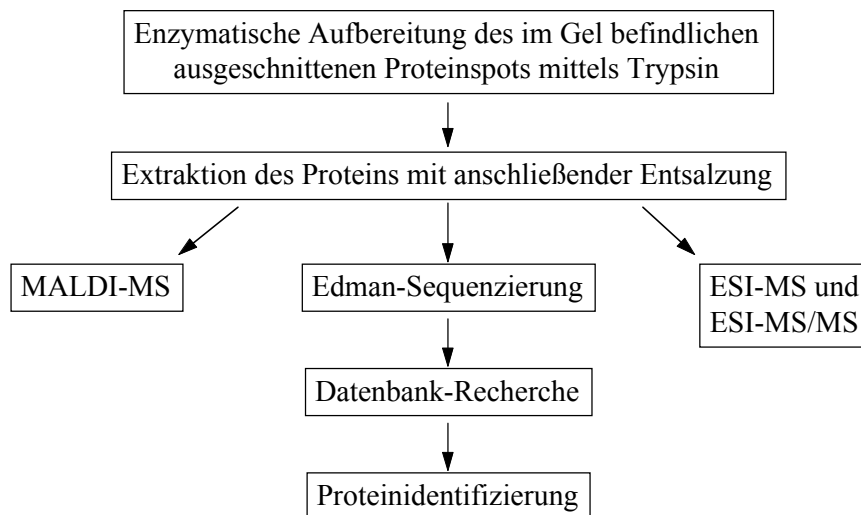


Abbildung 33: Schematischer Ablauf der Proteinsequenzierung

Mit Hilfe dieser Vorgehensweise konnten 5 Proteine durch die Anwendung verschiedener Sequenzierungsmethoden identifiziert werden (Tabelle 2). Es handelt sich mit Aktin um ein Protein mit Bedeutung für Zytoskelett-Funktionen. Die beiden Proteine MRP-8 und MRP-14 (migration inhibition factor-related protein) sind zwei Calcium-bindende Proteine der S-100-Familie. Desweiteren wurden mit alpha-Enolase und Katalase zwei Enzyme mit metabolischer Wirkung identifiziert.

Tabelle 2: Ergebnisse der Sequenzierung der Proteine 1-5. Es handelt sich um Kandidaten-Proteine mit regulatorischer Funktion für das Überleben neutrophiler Granulozyten.

Spot Nr.:	Protein	identifiziert durch:	MALDI-MS (peptid mass fingerprinting)	Sequenz in der Edman-Degradation bzw. Tandem-MS (Aminosäure-Position)
1	Aktin	MALDI-MS	977.8, 1133.3, 1200.2, 1501.2, 1517.7, 1517.7, 1792.9, 1955.8, 2233.4, 2749.1, 3202.7	
2	S108; MRP 8; Calgranulin A	MALDI-MS, Edman-Degradation	822.4, 963.2, 1272.7, 1435.8	ALNSIIDVDVYHK (8 to 18)
3	S 109; MRP14; CalgranulinB	MALDI-MS, Edman-Degradation	779.7, 877.7, 1004.8, 1455.1, 1444.7, 1758.8, 1807.1	KDLQNFLK (43 - 50)
4	Humane alpha-Enolase	MALDI-MS, Tandem-MS	1143.6, 1425.7, 1542.8, 1557.8, 1805.9, 1941.2, 1960.5, 2034.0, 2512.1, 3014.0	LFPDFFTR (228 - 235)
5	Humane Katalase	MALDI-MS	968.5, 1119.9, 1295.1, 1482.7, 1529.7, 1710.7, 1828.2, 2185.6, 2206.4, 2519.7	

### 3.1.4 Regulation der Apoptose durch extrazelluläre Matrix-Proteine

Lokale Entzündungen sind durch eine frühzeitige Akkumulation neutrophiler Granulozyten gekennzeichnet. Neutrophile Granulozyten dominieren das initiale perivaskulitische Zellinfiltrat bei Patienten mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden. Um den Ort des Entzündungsgeschehens zu erreichen, müssen sie aus dem Blutstrom durch die Gefäßwand in das betroffene Gewebe transmigrieren. Auf diesem Weg erfolgen vielfältige Kontakte mit Endothelzellen und extrazellulären Matrixsubstanzen. In der vorgelegten Arbeit wird die Hypothese untersucht, daß die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit extrazellulären Matrixproteinen das Apoptoseverhalten dieser Zellen modifiziert.

#### 3.1.4.1 Effekt von extrazellulären Matrixproteinen auf die spontane und auf die $TNF\alpha$ -vermittelte Apoptose

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert und unter nicht-adhärenenten sowie unter adhärenenten Bedingungen kultiviert. Vorgenommen wurden eine Beschichtung der Kulturplatten mit PolyHema, um die Adhärenz zu verhindern, und mit Fibronektin, um eine Interaktion der Zellen mit extrazellulärer Matrixsubstanz zu erlauben. Die Kultur erfolgte für maximal 28 Stunden. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, und die Apoptose-Rate wurde mittels Durchflußzytometrie quantifiziert (n=5). Aus Abbildung 34 ist zu ersehen, daß während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine signifikanten Unterschiede im spontanen Apoptose-Verhalten zu erkennen waren (Prozentsatz apoptotischer Zellen auf Fibronektin versus PolyHema nach 8 h:  $1\% \pm 0,5$  gegen  $0,6\% \pm 0,2$ ; nach 12

h:  $3\% \pm 2$  gegen  $1\% \pm 1$ ; nach 18 h:  $13\% \pm 5$  gegen  $14\% \pm 6$ ; nach 28 h:  $26\% \pm 6$  gegen  $34\% \pm 8$ ). Während des Beobachtungszeitraumes traten keine signifikante Reduktion der Zellzahl sowie, gemessen an der Fähigkeit, Trypan-Blau auszuschließen, keine Verminderung der Zellvitalität auf.

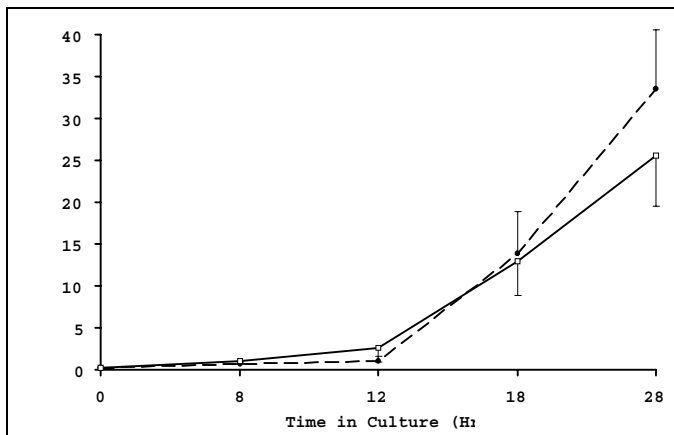


Abbildung 34: Der Effekt von Fibronectin und PolyHema auf die spontane Apoptose-Rate von neutrophilen Granulozyten. Die Zellen wurden entweder auf PolyHema (unterbrochene Linie) oder auf Fibronectin (durchgezogene Linie) kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die Zellen wurden mit Ethanol permeabilisiert und mit Propidium-Jodid gefärbt. Apoptose wurde mittels Durchflußzytometrie gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt.

Lokale Entzündungsreaktionen finden in einem Milieu statt, das durch die Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$  gekennzeichnet ist. Untersucht wurde der Effekt von extrazellulärer Matrix auf die Apoptose-Rate  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierter neutrophiler Granulozyten. Die Zellen wurden entweder auf PolyHema oder auf Fibronectin kultiviert und mit 20 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert ( $n=3$ ). Es war eine deutliche zeitabhängige Beschleunigung der Apoptose zu beobachten, wenn die Zellen auf Fibronectin inkubiert wurden (Abbildung 35). Nach einer Stunde war der Anteil apoptotischer Zellen  $<1\%$  auf beiden Oberflächen, Fibronectin und PolyHema. Nach 2 Stunden lagen diese Werte bei  $9\% \pm 1\%$  versus  $5\% \pm 1\%$  ( $p < 0,05$ ). Nach 4 Stunden war die Differenz  $19\% \pm 2\%$  gegen  $9\% \pm 1\%$ , ( $p < 0,05$ ). Nach 8 Stunden fanden sich  $28\% \pm 2\%$  apoptotische PMN auf Fibronectin, verglichen mit  $11\% \pm 2\%$  auf PolyHema ( $p < 0,001$ ), und nach 12 Stunden lagen diese Werte bei  $25\% \pm 2\%$  versus  $9\% \pm 1\%$ , ( $p < 0,001$ ).

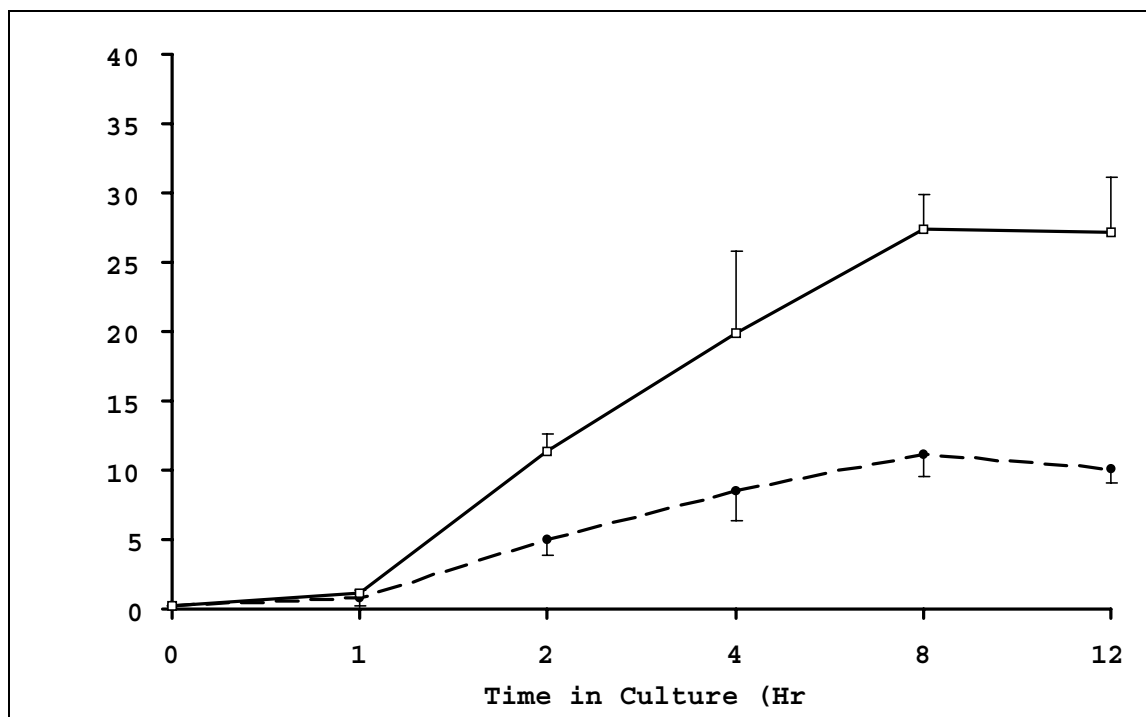


Abbildung 35: Der Effekt von Fibronectin und PolyHema auf die Apoptose-Rate von  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten neutrophilen Granulozyten.  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Zellen wurden entweder auf PolyHema (unterbrochene Linie) oder auf Fibronectin (durchgezogene Linie) kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die Zellen wurden mit Ethanol permeabilisiert und mit Propidium-Jodid gefärbt. Apoptose wurde mittels Durchflußzytometrie gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt.

Die Aussage der durchflußzytometrischen Untersuchungen wurde mit einem zusätzlichen Test, dem DNA-Fragmentations-Assay, überprüft. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der FACS-Analyse zeigte auch diese Untersuchung, daß Apoptose, hier gekennzeichnet durch das Auftreten von internukleosomaler DNA-Spaltung, einem Schlüssel-Charakteristikum der Apoptose, nur in den Zellen zu beobachten war, die in Anwesenheit von 20 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  kultiviert wurden (Abbildung 36). Die DNA-Fragmentierung trat dabei auf beiden Kulturoberflächen auf, war jedoch stärker ausgeprägt, wenn die Zellen auf Fibronectin inkubiert wurden. Keine niedrigmolekularen DNA-Fragmente (sog. "DNA-Leitern") fanden sich hingegen bei unbehandelten Kontrollen.

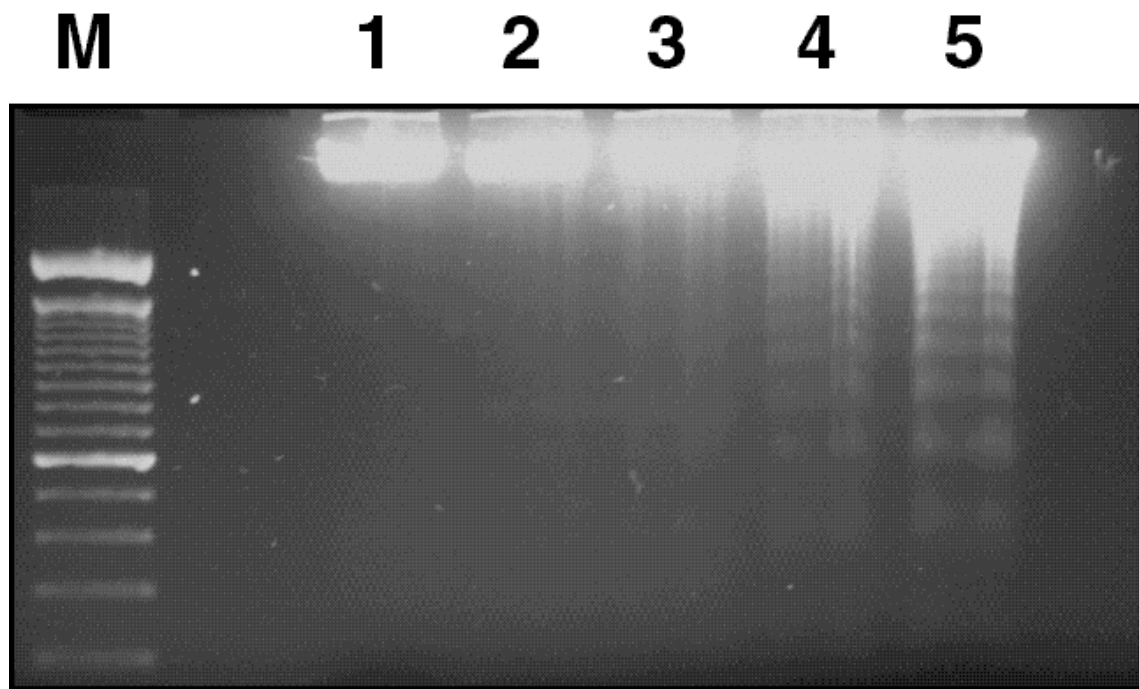


Abbildung 36: Der Effekt von Fibronectin und PolyHema auf die DNA-Fragmentierung von  $\text{TNF}\alpha$ -behandelten neutrophilen Granulozyten. Keine DNA-Fragmentation wurde in frisch isolierten Zellen (Bahn 1) und in unbehandelten Zellen auf PolyHema (Bahn 2) und Fibronectin (Bahn 3) beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigen  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Zellen auf PolyHema (Bahn 4) und auf Fibronectin (Bahn 5) typische niedrigmolekulare DNA-Fragmente. Die DNA-Fragmentierung war stärker ausgeprägt, wenn die Zellen auf Fibronectin kultiviert wurden. Bahn M zeigt die 100 bp DNA-Marker. Ein typisches Beispiel von 2 separaten Experimenten ist abgebildet.

Fibronectin ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das als Bestandteil des Interstitiums vorkommt, aber auch als lösliches Fibronectin im Blut zirkuliert. Verglichen wurde nachfolgend der Effekt von Fibronectin, das auf den Kulturplatten immobilisiert wurde, mit dem Effekt, den der Zusatz von löslichem Fibronectin zu neutrophilen Granulozyten in Suspension auf die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Apoptose hat. Die Zellen wurden für 4 Stunden in Suspension unter Hinzugabe ansteigender Dosen von löslichem humanen Fibronectin (5-75  $\mu\text{g/ml}$ ) kultiviert. Die Ergebnisse zeigen, daß lösliches Fibronectin im Gegensatz zu immobilisiertem Fibronectin nicht zu einer Akzeleration der Apoptose führte (Abbildung 37) ( $n=5$ ).

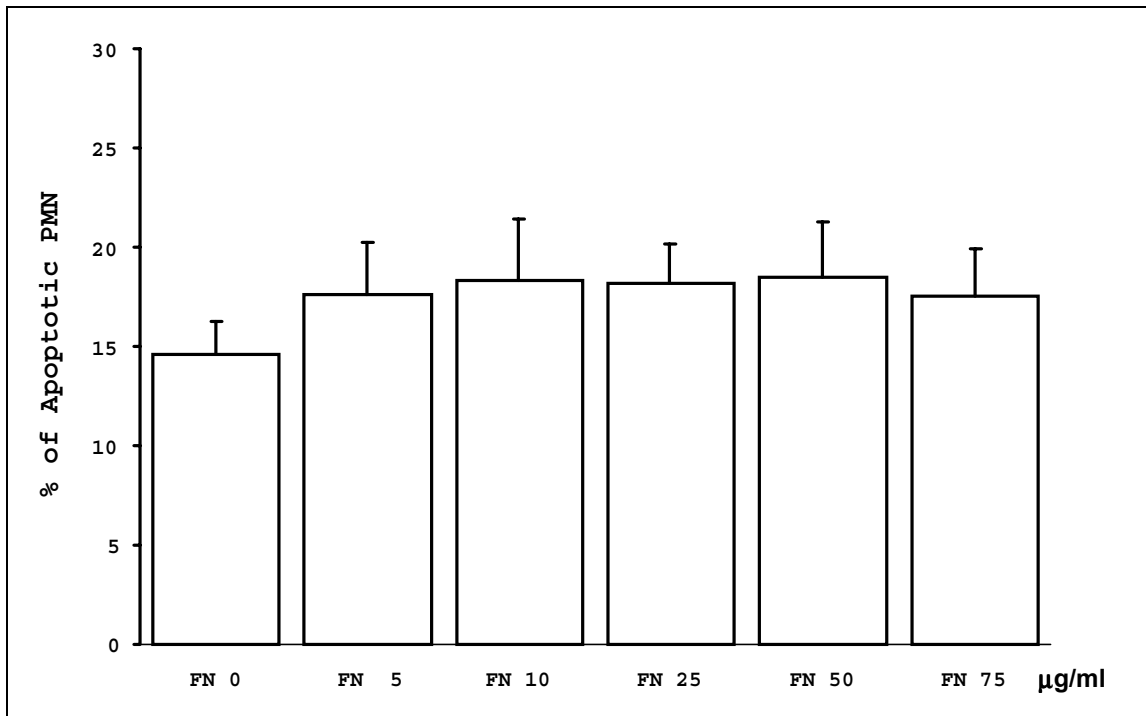


Abbildung 37: Der Effekt von löslichem Fibronectin auf die Apoptose von  $\text{TNF}\alpha$ -behandelten neutrophilen Granulozyten in Suspension.  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Zellen (20 ng/ml) wurden für 4 Stunden in der Anwesenheit ansteigender Konzentrationen von löslichem Fibronectin (5 to 75 mg/ml) in Polypropylen-Röhrchen als Zellsuspension kultiviert. Die Proben wurden nach Ethanol-Permeabilisierung und Propidium-Jodid-Färbung mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt (n=5).

Neben Fibronectin kommen eine Reihe weiterer extrazellulärer Matrixproteine für eine Interaktion mit neutrophilen Granulozyten während der Entzündungsreaktion in Betracht. Untersucht wurde der Einfluß von Kollagen Typ I und Typ IV sowie von Laminin auf die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Apoptose. Basierend auf den Experimenten zum Zeitverlauf der  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Apoptose auf Fibronectin wurde der 8-Stunden-Zeitpunkt für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Apoptose-Rate ein Plateau erreicht. Fibronectin, Kollagen Typ I und Typ IV sowie Laminin wurden auf den 6-well-Kulturplatten immobilisiert und  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Zellen derselben Spender-Präparation wurden für 8 Stunden auf den verschiedenen Oberflächen kultiviert (n=6). Die Ergebnisse zeigen gegenüber der nicht-adhärenenten Beschichtung mit PolyHema einen signifikanten Anstieg der Apoptose auf allen Matrices (Abbildung 38). Die Apoptose-Rate betrug  $8\pm 1\%$  auf PolyHema und stieg auf  $26\pm 4\%$  für Fibronectin, auf  $17\pm 2\%$  für Kollagen I, auf  $16\pm 2\%$  für Kollagen IV und auf  $17\pm 3\%$  für Laminin an. Der Anstieg auf Fibronectin war signifikant höher als auf allen anderen Matrix-Proteinen ( $p < 0,05$ ).

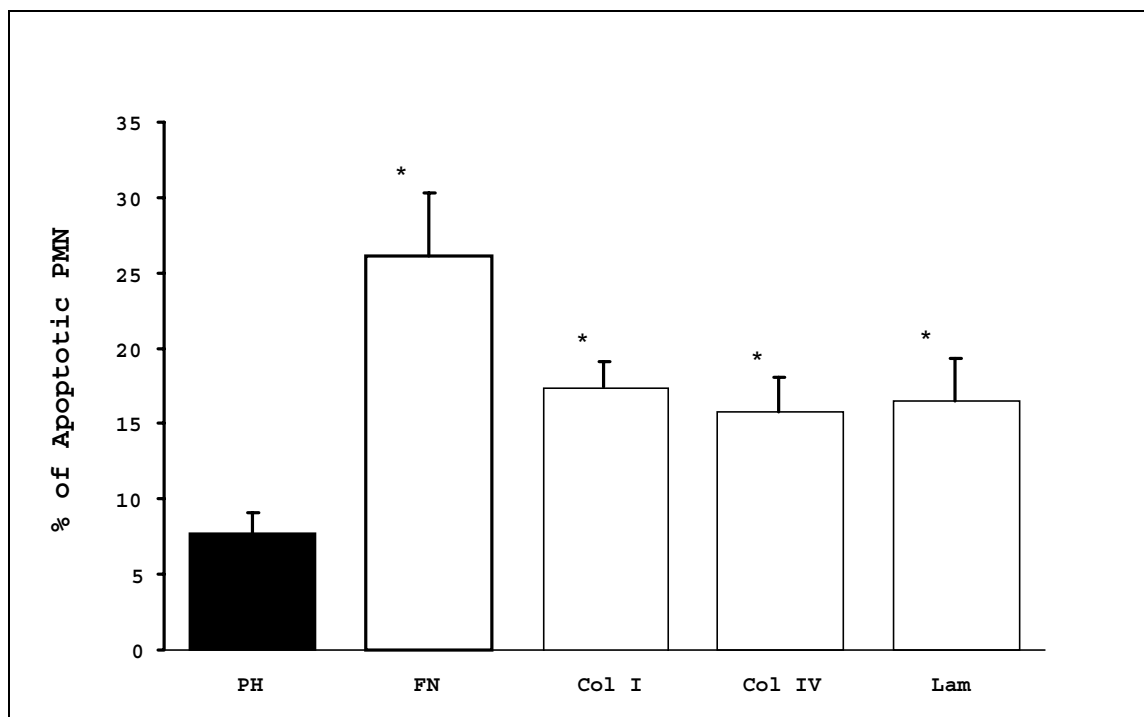


Abbildung 38: Der Effekt von verschiedenen extrazellulären Matrix-Proteinen auf die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Apoptose. Neutrophile Granulozyten wurden auf PolyHema (PH), Fibronectin (FN), Kollagen I (Col I), Kollagen IV (Col IV) und auf Laminin (Lam) für 8 h kultiviert. Die Zellen wurden mit Ethanol permeabilisiert und mit Propidium-Jodid gefärbt. Apoptose wurde mittels Durchflußzytometrie gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt (n=6). \*Die Differenzen zwischen allen Matrices und PolyHema ( $p < 0,05$ ) sowie zwischen Fibronectin und allen anderen Matrix-Proteinen ( $p < 0,05$ ) waren signifikant.

### 3.1.4.2 Signaltransduktion der Fibronectin-induzierten Akzeleration von $\text{TNF}\alpha$ -vermittelter Apoptose

#### 3.1.4.2.1 Der Effekt von Inhibitoren der Signaltransduktion

Im folgenden wurde die Signaltransduktion der Akzeleration von  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelter Apoptose durch extrazelluläre Matrix untersucht. Als erstes erfolgte die Testung der Wirkung verschiedener Hemmer von Signaltransduktionswegen. Die Ergebnisse in Abbildung 39 demonstrieren, daß die Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung mit 50  $\mu\text{M}$  Genistein zu einer starken Inhibierung der Apoptose auf Fibronectin ( $39 \pm 4\%$  auf  $21 \pm 4\%$ ;  $p < 0,0001$ ) und auf Poly-l-lysine ( $28 \pm 4\%$  auf  $21 \pm 4\%$ ;  $p < 0,05$ ) führte, wohingegen kein signifikanter Genistein-Effekt auf PolyHema zu beobachten war ( $20 \pm 4\%$  auf  $16 \pm 4\%$ ) (n=8). Interessanterweise wurde durch Genistein die Apoptose-Rate auf beiden adhärennten Oberflächen auf Werte vermindert, die der Apoptose auf der nicht-adhärennten Bedingung (PolyHema) entsprachen.

Beim Einsatz weiterer Signaltransduktionshemmer konnte in 5 Experimenten kein Effekt der MAP-Kinase-Inhibitoren SB 202190 und PD 98059 (10 nM bis 1 mM) sowie der PKC-Inhibitoren Calphostin und Staurosporin (10 nM) auf die Fibronectin-akzelerierte Apoptose demonstriert werden (Daten nicht gezeigt).

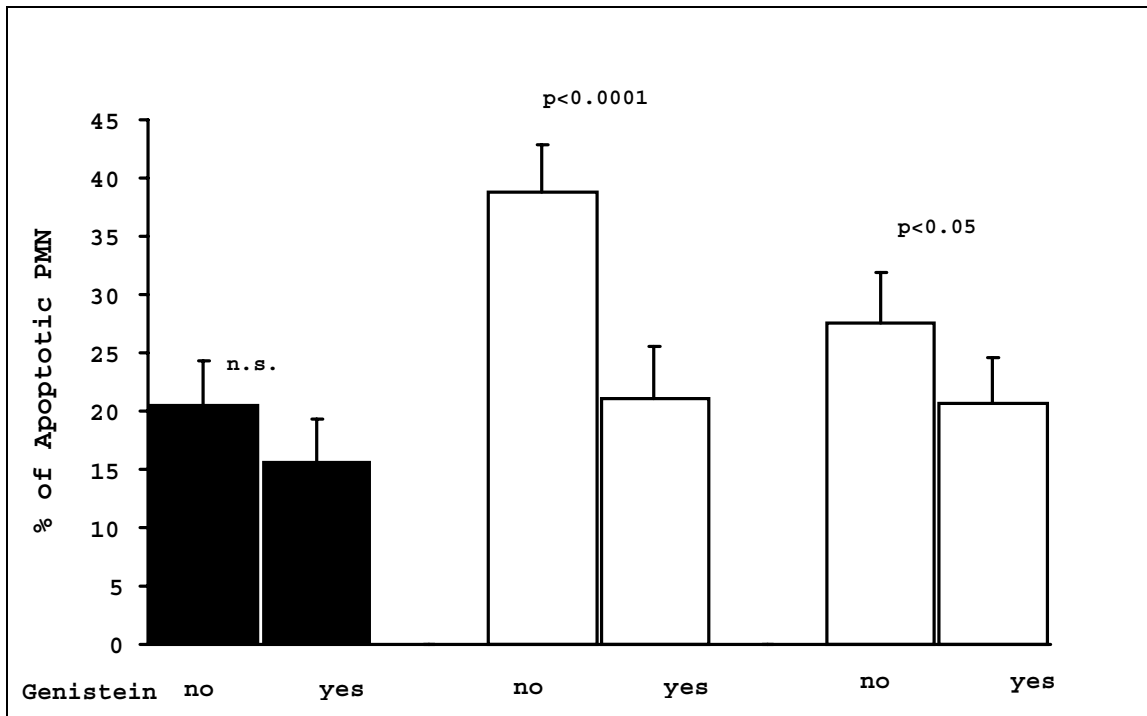


Abbildung 39 : Der Effekt von Genistein auf die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Apoptose. Neutrophile Granulozyten wurden auf Zellkultur-Platten kultiviert, die mit PolyHema, Fibronectin oder Poly-L-lysine beschichtet waren. Es erfolgte eine Stimulation mit 20 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  ohne oder mit Vorinkubation in Genistein (50  $\mu\text{M}$ ). Apoptose wurde nach Ethanol-Permeabilisierung und Propidium-Jodid-Färbung der Zellen mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Eine signifikante Hemmung durch Genistein war in  $\text{TNF}\alpha$ -behandelten Zellen auf Fibronectin (offene Säulen) und auf Poly-L-lysine (schraffierte Säulen), aber nicht auf PolyHema (schwarze Säulen) zu beobachten.

#### 3.1.4.2.2 Charakterisierung der Tyrosin-Phosphorylierung

Der beobachtete Effekt von Genistein auf die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Apoptose auf Fibronectin deutet auf eine zentrale Rolle der Tyrosin-Phosphorylierung hin. Es erfolgten deshalb detaillierte Untersuchungen zu diesem Signaltransduktionsweg. Neutrophile Granulozyten wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von 20 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  entweder auf PolyHema oder auf Fibronectin für 15, 30 oder 60 Minuten kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blotting mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper analysiert (Abbildung 40). Nach 15 Minuten war bei keiner der Bedingungen ein signifikanter Anstieg in der Tyrosin-Phosphorylierung zu erkennen. Nach 30 Minuten ließ sich in den  $\text{TNF}\alpha$ -behandelten Proben auf Fibronectin eine verstärkte Phosphorylierung von Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 54 und 95 kDa feststellen. Die Phosphorylierung dieser Proteine verstärkte sich weiter nach 60 Minuten. Zu diesem Zeitpunkt war auch eine verstärkte Phosphorylierung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 102, 89, 63 und 51 kDa nachweisbar. Von besonderem Interesse war das Auftreten neuer Phosphorylierungsbanden mit einem Molekulargewicht von 185, 85, 66, 56 und 42 kDa.



Die konfokale Mikroskopie wurde eingesetzt, um die Lokalisation der Tyrosin-phosphorylierten Proteine in der Zelle zu analysieren. Tyrosin-Phosphorylierung wurde dazu in  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten Zellen auf Fibronectin und auf PolyHema untersucht. In Übereinstimmung mit den gezeigten Daten der Western-Blot-Untersuchungen konnte auch in der konfokalen Mikroskopie eine dramatische Hochregulation der Tyrosin-Phosphorylierung nach 60 Minuten beobachtet werden, wenn  $\text{TNF}\alpha$ -behandelte Zellen mit Fibronectin interagierten (Abbildung 41; vergleiche Panel A mit B; Quantifizierung in Panel C). Die Adhärenz auf Fibronectin war begleitet von einer Veränderung der Zell-Form (Panel D). Die Zellen wiesen ein sog. Spreading auf. Orte der höchsten Tyrosin-Phosphorylierung finden sich im Zytoplasma und in den zellulären Fortsätzen, die den Zell-Matrix-Kontakt vermitteln (sog. focal adhesion sites). Die vertikale Analyse (z-Achse) demonstrierte anschaulich eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung an den Zellgrenzen und im Zytoplasma (Panel E).

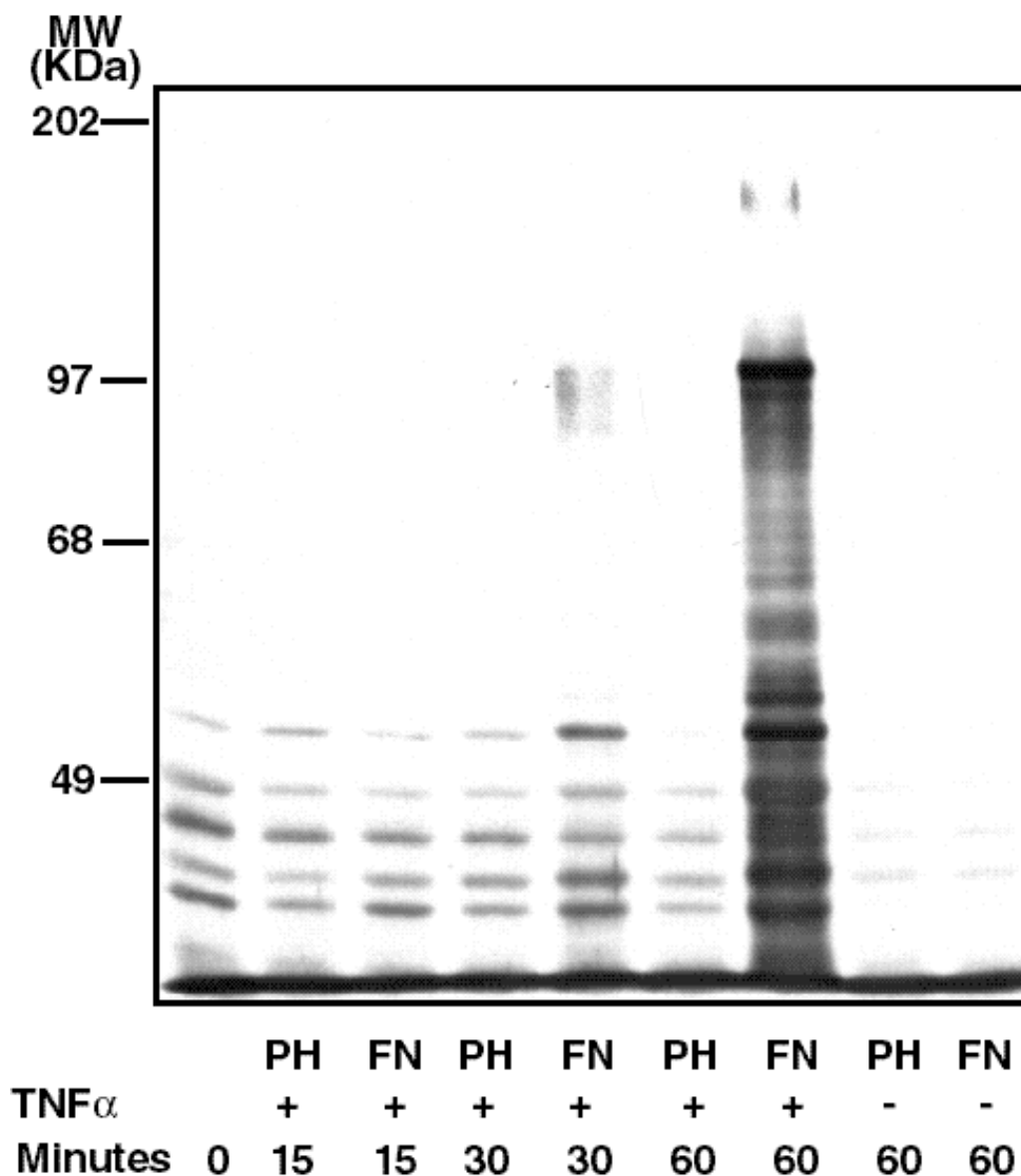


Abbildung 40: Messung der Tyrosin Phosphorylierung mittels Western-Blotting. Die Zellen wurden auf Fibronectin oder auf PolyHema in Anwesenheit oder Abwesenheit von 20 ng/ml TNF $\alpha$  kultiviert. Die Proben wurden nach 15, 30 und 60 Minuten geerntet. 50  $\mu$ g Protein pro Bahn wurden für die Elektrophorese eingesetzt, geblottet und mit einem monoklonalen Antikörper (PY20) gegen Phosphotyrosin entwickelt. Die Tyrosin-Phosphorylierung der Proteinbanden mit 102, 95, 89, 63, 54 und 51 kDa war hochreguliert, wenn TNF $\alpha$ -behandelte Zellen auf Fibronectin kultiviert wurden. Neue Tyrosin-phosphorylierte Banden waren bei 185, 85, 66, 56 und 42 kDa sichtbar. Ein typisches Beispiel von 3 unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

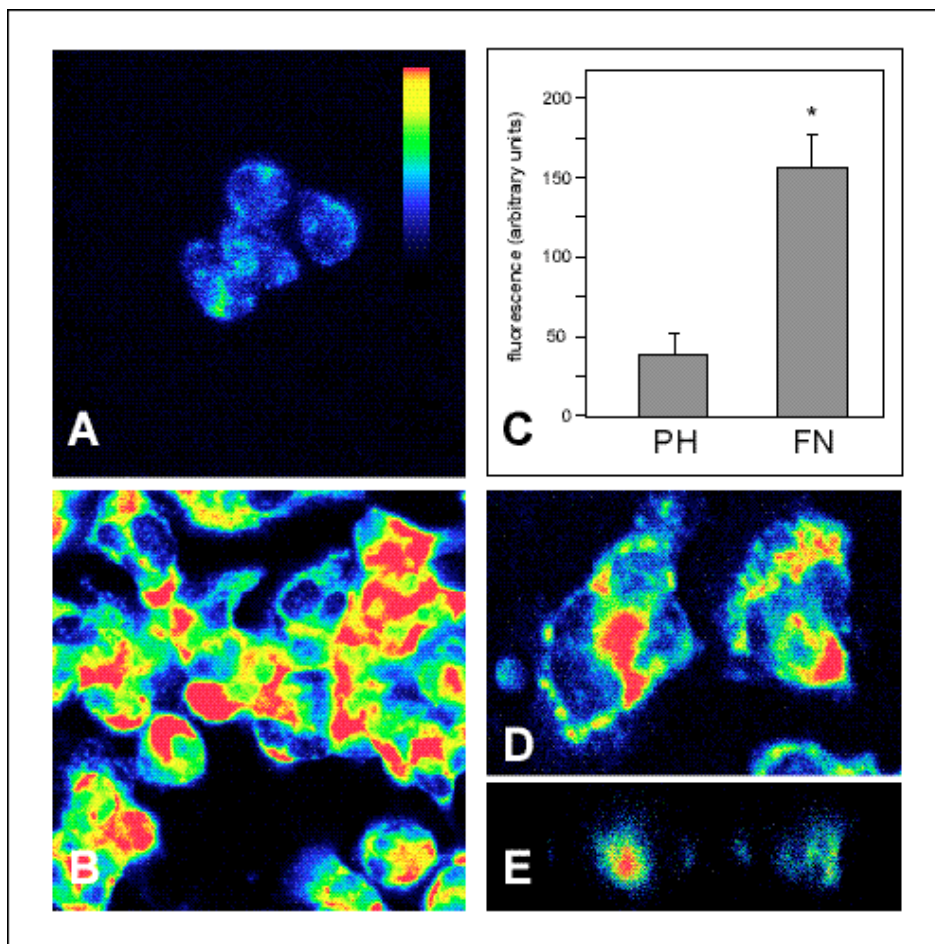


Abbildung 41: Konfokale Mikroskopie der Tyrosin-Phosphorylierung in  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten neutrophilen Granulozyten auf PolyHema (Panel A) und auf Fibronektin (Panel B). Eine starke Hochregulation der Tyrosin-Phosphorylierung war in den  $\text{TNF}\alpha$ -behandelten Zellen auf Fibronektin zu erkennen (Panel B). Die semi-quantitative Analyse ist in Panel C gezeigt. Die Zellen auf Fibronektin weisen ein charakteristisches Spreading auf. Eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung ist an den Orten des Zell-Matrix-Kontaktes sowie im Zytoplasma zu sehen (Panel D, horizontaler Schnitt). In Panel E, einer Analyse in der vertikalen Achse (z-Achse), ist die gesteigerte Tyrosin-Phosphorylierung an den Zell-Matrix-Kontaktstellen und im Zytoplasma zu sehen. Eine repräsentative Untersuchung von 3 unabhängigen Experimenten ist abgebildet.

#### 3.1.4.2.3 Identifizierung von Ly-GDI als ein Substrat der Tyrosin-Phosphorylierung

Die vorgelegten Daten demonstrieren überzeugend, daß die Interaktion von  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten neutrophilen Granulozyten mit extrazellulären Matrix-Proteinen zu einer Akzeleration der Apoptose führt und daß dieser Prozeß über die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen reguliert wird. In den folgenden Untersuchungen standen die Substrate dieser Tyrosin-Phosphorylierung im Mittelpunkt. Zu diesem Zweck wurden 2D-Gel-Elektrophoresen, gefolgt von Western-Blotting mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin durchgeführt. Die Zellen wurden in der Anwesenheit von 20 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  entweder auf Fibronektin oder auf PolyHema für 60 Minuten kultiviert. Zellen auf Fibronektin ohne  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation wurden als Kontrolle im selben Experiment mitgeführt.

Abbildung 42 läßt erkennen, daß eine ganze Gruppe von höhermolekularen sauren Proteinen, aber auch 11 gut abgrenzbare Spots nur dann Tyrosin-phosphoryliert wurden, wenn  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Zellen mit Fibronectin interagierten ( $n=3$ ). Diese Proteine wurden weder bei der  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation auf PolyHema, noch bei der Kultivierung nicht-stimulierter Zellen auf Fibronectin phosphoryliert.

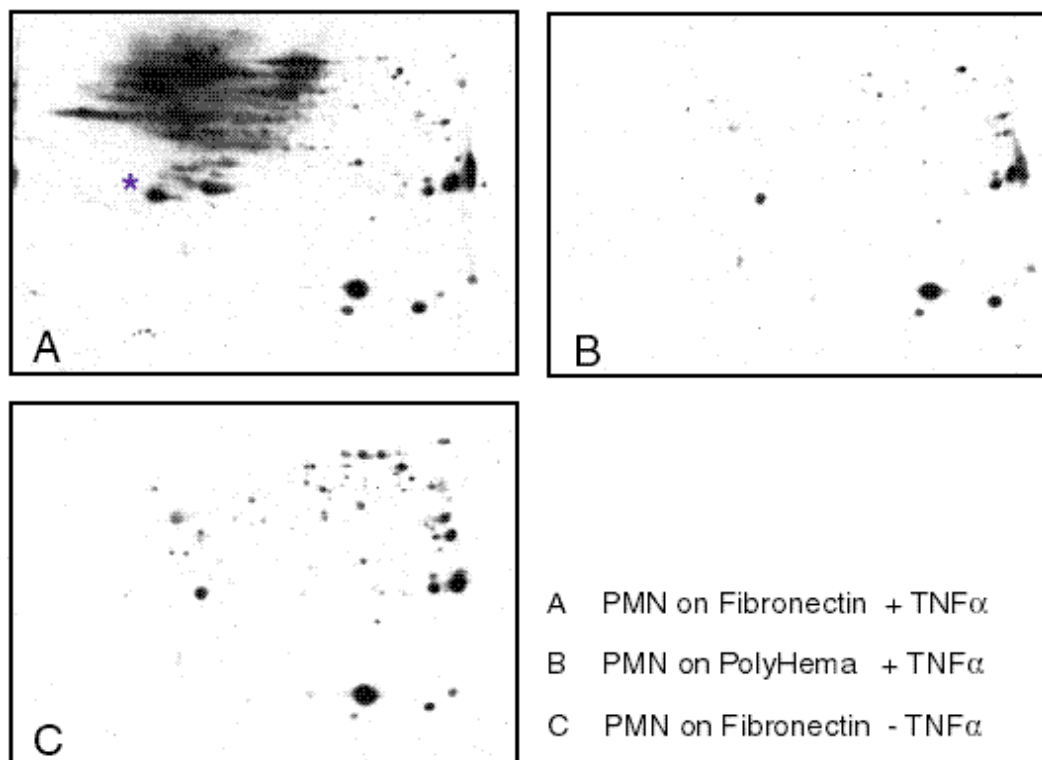


Abbildung 42: 2D-Gelelektrophorese und Western-Blotting zur Untersuchung des Effektes von Fibronectin und  $\text{TNF}\alpha$  auf die Tyrosin-Phosphorylierung. Neutrophile Granulozyten wurden auf Fibronectin oder auf PolyHema kultiviert und entweder mit 20 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert oder ohne Stimulation kultiviert. Die Proben wurden nach 60 Minuten lysiert, und 100  $\mu\text{g}$  Protein/Gel wurde elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und unter Verwendung eines Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers (PY20) entwickelt. Die Zahl der Tyrosin-phosphorylierten Spots war in  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten PMN auf Fibronectin deutlich hochreguliert (Panel A), wohingegen wenig Phosphorylierung in  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten Zellen auf PolyHema (Panel B) oder in unstimulierten Zellen auf Fibronectin nachweisbar war (Panel C). Der mit einem Stern markierte Spot (\*) konnte im korrespondierenden Coomassie-gefärbten Gel identifiziert werden.

Einer dieser Spots (in Abbildung 42 mit einem Stern markiert) konnte auch in den gleichzeitig durchgeführten Coomassie-gefärbten Gelen identifiziert werden. Das Protein wurde aus dem Gel ausgeschnitten, Trypsin-behandelt, gereinigt und anschließend konzentriert. Die Protein-Analyse erfolgte mittels Nanoelektrospray-Massen-Spektrometrie. Mit der Elektrospray-Ionisierungs-Massen-Spektrometrie (ESI-MS) wurde ein Peptid-Massen-Fingerprint durchgeführt (Abbildung 43). Die Identität des identifizierten Proteins wurde in der Tandem-Massen-Spektrometrie bestätigt. Mit diesen Methoden konnte das Protein identifiziert werden. Es handelt sich um Ly-GDI

(lymphoid-specific guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor), auch D4-GDI genannt. In einem kalibrierten 2-DE-Gel war ersichtlich, daß Ly-GDI als ein 27 kDa Protein mit einem pI von 5,1 läuft.

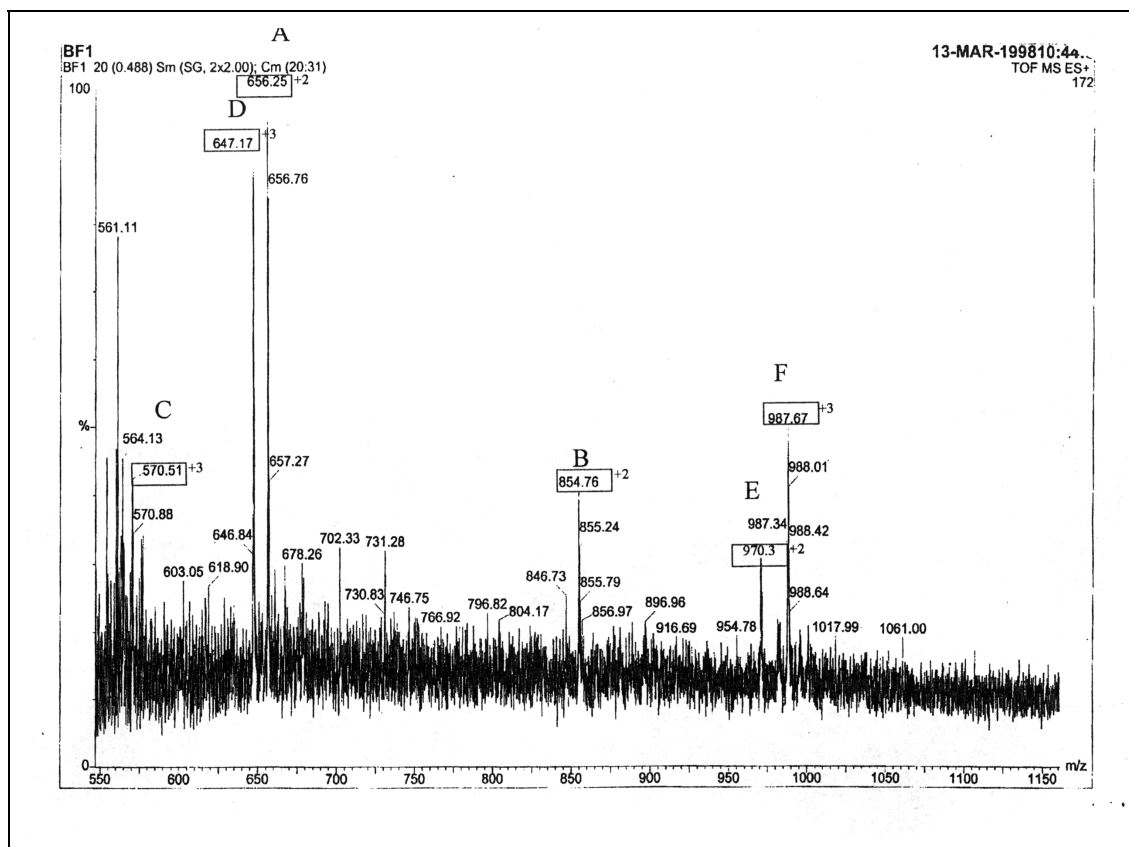


Abbildung 43: Die Identifizierung von Ly-GDI mittels Nanoelectrospray-Massen-Spektrometrie. Die Peptid-Ionen-Massen-Karte, die Masse der Fragmente A-F, die identifizierten Aminosäuresequenzen und deren Position im Ly-GDI Molekül sind dargestellt.

Nachdem Ly-GDI als ein Substrat der Tyrosin-Phosphorylierung identifiziert wurde, erfolgten Untersuchungen zur Protein-Expression. Untersucht wurde dabei der Effekt von  $\text{TNF}\alpha$  und Fibronectin auf die Expression von Ly-GDI. Neutrophile Granulozyten derselben Präparation wurden mit  $\text{TNF}\alpha$  (20 ng/ml) stimuliert und entweder auf Fibronectin oder PolyHema inkubiert, oder die Zellen wurden unstimuliert auf Fibronectin kultiviert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Proben geerntet und mittels SDS-PAGE und Western-Blotting analysiert. Verwendet wurde ein spezifischer polyklonaler Antikörper gegen Ly-GDI. In Abbildung 44 (Panel A-C) läßt sich erkennen, daß neutrophile Granulozyten eine 27-kDa-Protein-Bande aufweisen, die dem intakten Ly-GD-Protein entspricht. Die Expression der 27-kDa-Bande wurde mit Hilfe der optischen Densitometrie quantifiziert und es konnte nachgewiesen werden, daß die Behandlung der Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  zu einer Verminderung der Expression der 27-kDa-Bande führte (Abbildung 45). Die Abnahme an intaktem Ly-GDI begann zwischen der ersten und der zweiten Stunde der  $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung und ließ sich auf beiden Oberflächen nachweisen. Fibronectin bewirkte eine stärkere

Spaltung von intaktem Ly-GDI als PolyHema. Nach 8 h war intaktes Ly-GDI durch Fibronectin auf 32% und durch PolyHema auf 65,8% vermindert worden. Die Verminderung des intakten Ly-GDI-Proteins wurde vom Auftreten einer neuen Bande von 23 kDa begleitet. Diese neue Bande zeigt an, daß  $\text{TNF}\alpha$  zur Spaltung von Ly-GDI führt und daß es sich bei der 23-kDa-Bande um ein Spaltprodukt handelt.

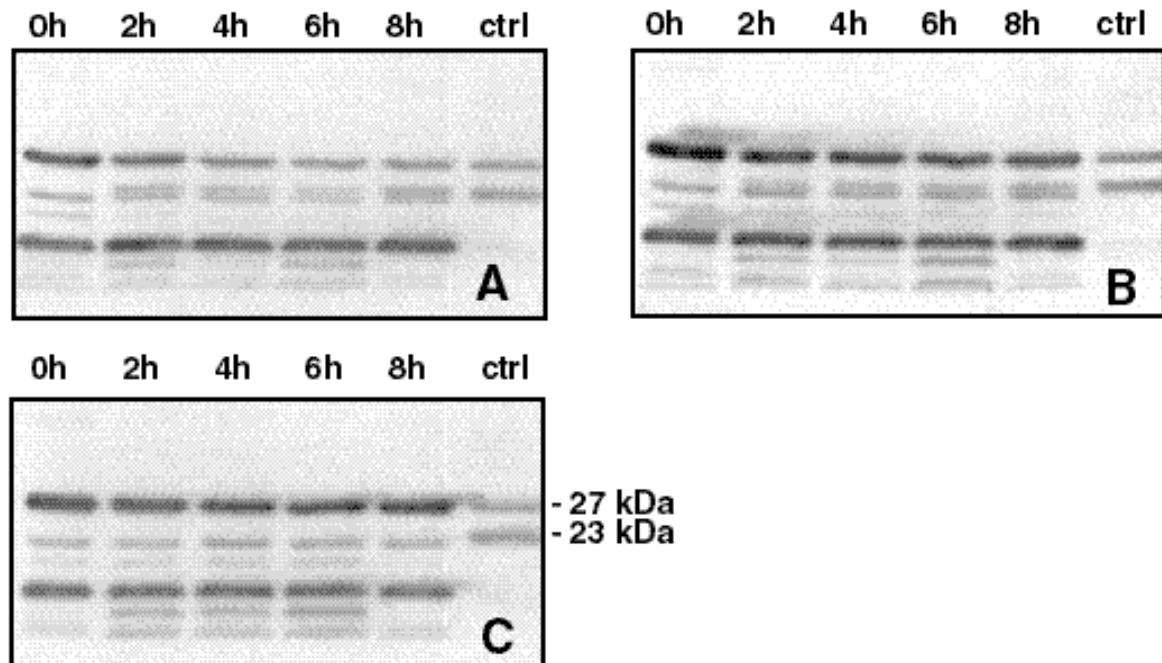


Abbildung 44: Zeitverlauf der Spaltung von Ly-GDI. Neutrophile Granulozyten wurden mit 20 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert und auf Fibronectin (Panel A) oder PolyHema (Panel B) kultiviert. Kontrollen wurden auf Fibronectin ohne Stimulation inkubiert (Panel C). Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und lysiert. 30  $\mu\text{g}$  Protein wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet, und die Blots wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen Ly-GDI entwickelt.  $\text{TNF}\alpha$  führte zur Abnahme von intaktem Ly-GDI und zum Auftreten eines 23-kDa-Spaltproduktes. Die Interaktion  $\text{TNF}\alpha$ -behandelter Zellen mit Fibronectin verstärkt die Spaltung von intaktem Ly-GDI.

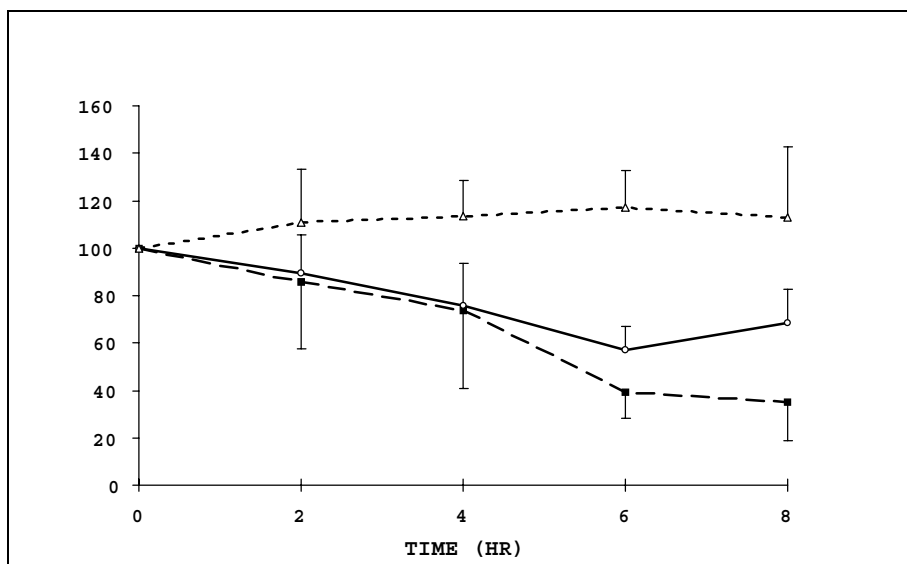


Abbildung 45: Bestimmung der Ly-GDI-Protein-Expression mittels optischer Densitometrie. Die Behandlung der neutrophilen Granulozyten mit TNF $\alpha$  führt zu einer zeitabhängigen Abnahme der Ly-GDI-Expression. Im Vergleich zu PolyHema (o) war dieser Effekt stärker, wenn die Zellen auf Fibronectin (•) kultiviert wurden. Die Inkubation auf Fibronectin ohne Stimulation mit TNF $\alpha$  führte zu keiner Abnahme der Ly-GDI Expression (Δ). Für die optische Densitometrie wurden eingescante Röntgenfilme der Western-Blot Analysen verwendet.

Wenn TNF $\alpha$ -behandelte neutrophile Granulozyten mit z-DEVD-fmk, einem Tetrapeptid mit Caspase-3-spezifischer Hemmung, vorinkubiert wurden, konnte die Spaltung von intaktem Ly-GDI inhibiert und die Generation des 23 kDa-Spaltproduktes verhindert werden (Abbildung 46).

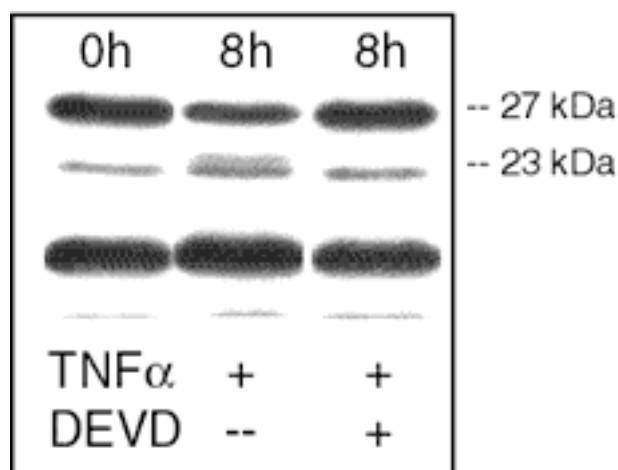


Abbildung 46: Der Effekt des Caspase-3-Hemmers z-DEVD-cmk auf die TNF $\alpha$ -vermittelte Spaltung von Ly-GDI wurde untersucht. Neutrophile Granulozyten wurden mit 100 $\mu$ M z-DEVD-cmk oder mit derselben Menge Lösungsmittel vorinkubiert und anschließend mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert. Nach 8 Stunden Inkubation wurden die Zellen lysiert. 30  $\mu$ g Protein wurde elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet, und die Blots wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen Ly-GDI entwickelt. Die

TNF $\alpha$ -vermittelte Spaltung von intaktem Ly-GDI sowie die Generation des 23 kDa Fragmentes wurden durch 100  $\mu$ M z-DEVD-cmk gehemmt.

Im Anschluß an diese Befunde wurde die Hypothese getestet, daß Caspase-3 die apoptotische Antwort neutrophiler Granulozyten vermittelt. Dazu wurde der Effekt der spezifischen Hemmung von Caspase-3 und Caspase-1 auf die TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose untersucht. Kontroll-Zellen wurden auf Fibronectin oder auf PolyHema mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert. Zellen derselben Präparation wurden vor der TNF $\alpha$ -Stimulation mit ansteigenden Dosen (1-100  $\mu$ M) von z-DEVD-fmk, zur Hemmung von Caspase-3, oder YVAD-cmk, zur Hemmung von Caspase-1, vorinkubiert. Nach 8 Stunden erfolgte die Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels Propidium-Jodid-Färbung und Durchflußzytometrie. Abbildung 47 zeigt, daß die Vorinkubation mit z-DEVD-fmk zu einer Dosis-abhängigen Hemmung der TNF $\alpha$ -vermittelten Apoptose auf beiden Oberflächen führte.

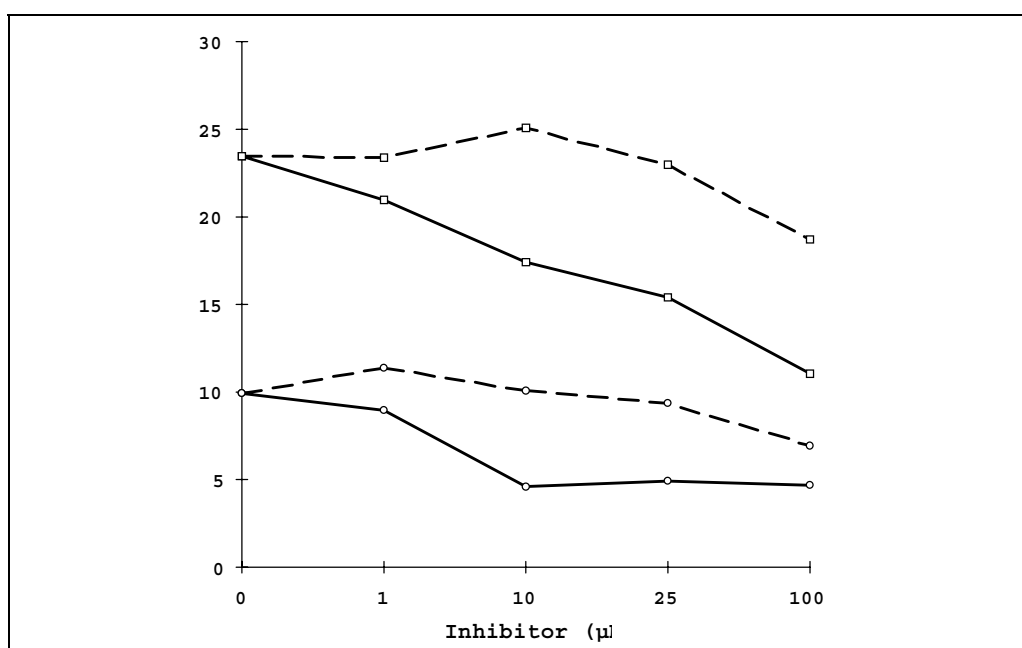


Abbildung 47: Der Effekt des Caspase-3-Hemmers z-DEVD-cmk und des Caspase-1-Hemmers YVAD-cmk auf die TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose auf Fibronectin (quadratische Symbole) und auf PolyHema (Kreise) wurde untersucht. Dazu wurden neutrophile Granulozyten mit steigenden Dosen von entweder z-DEVD-cmk (durchgezogene Linie) oder YVAD-cmk (gestrichelte Linie) vorinkubiert und dann mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  behandelt. Nach 8 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit Ethanol permeabilisiert und mit Propidium-Jodid gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte dargestellt (n=5).

Der Prozentsatz apoptotischer Zellen war auf Fibronectin: 23,5% $\pm$ 3,0 für die unbehandelten Kontrollen, 20,9% $\pm$ 3,2 für 1  $\mu$ M z-DEVD-fmk, 17,5% $\pm$ 5,1 für 10  $\mu$ M, 15,4% $\pm$ 2,4 für 25  $\mu$ M und 11,0% $\pm$ 3,1 für 100  $\mu$ M. Die Behandlung TNF $\alpha$ -stimulierter Zellen mit z-DEVD-fmk auf PolyHema führte zu folgenden Apoptoseraten: 9,9% $\pm$ 1,0 für die Kontrollen, 9,0% $\pm$ 1,5 für 1  $\mu$ M, 4,6% $\pm$ 1,1 für 10  $\mu$ M, 4,9% $\pm$ 0,9 für 25  $\mu$ M und 4,7% $\pm$ 1,4 for 100  $\mu$ M. Der Effekt von z-DEVD-fmk war auf beiden Oberflächen signifikant für die Konzentrationen 10, 25 und 100  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ). Die Vorinkubation der



Zellen mit dem Caspase-1-Hemmer YVAD-cmk zeigte keine Dosis-abhängige Wirkung auf die Apoptose, nur die höchste Konzentration von 100  $\mu$ M führte zu einer Hemmung von etwa 20%.

## 4 Diskussion

Am Beginn der vorliegenden Arbeit wurde die zentrale Rolle der "Dreiecksbeziehung" von ANCA, neutrophilen Granulozyten und Endothel im pathogenetischen Konzept ANCA-assoziiierter Erkrankungen betont. Dabei ist die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA für die Auslösung der Schädigung bedeutsam, und diese Problematik wird im ersten Abschnitt der Diskussion erörtert. Die Beseitigung von neutrophilen Granulozyten durch Apoptose ist kritisch für die Auflösung von Entzündungsreaktionen. Auf die Bedeutung der Apoptose bei ANCA-Vaskulitiden soll im zweiten Abschnitt eingegangen werden.

### 4.1 Mechanismen der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA

Die dargestellten Ergebnisse demonstrieren, daß die Bindung der ANCA an ihre Ziel-Antigene auf der Zelloberfläche und die effektive Quervernetzung der präsentierten Antigene die Abgabe von Superoxid in neutrophilen Granulozyten stimulieren. Der Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor ist für diesen Initiierungs-Prozeß nicht essentiell. Die Interaktion von ANCA mit dem Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor übt jedoch eine modulierende Wirkung auf die Aktivierung aus. Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA nimmt eine zentrale Stellung in den Konzepten zur Pathophysiologie ANCA-assoziiierter Vaskulitiden ein. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen helfen, die zugrunde liegenden Mechanismen der Aktivierung durch ANCA besser zu verstehen.

Das Priming neutrophiler Granulozyten, in unseren Experimenten durch die Inkubation mit TNF $\alpha$  durchgeführt, bewirkt eine Translokation von PR3 und MPO aus den primären Granula auf die äußere Zelloberfläche (Charles, 1991). Diese Translokation ist notwendig, damit ANCA mit ihren Ziel-Antigenen interagieren und somit die Aktivierung der Granulozyten auslösen können. Tatsächlich ist gezeigt worden, daß neutrophile Granulozyten von Patienten mit Wegener'scher Granulomatose PR3 auf ihrer Zellmembran präsentieren (Csernok, 1994; Muller Kobold, 1998). Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurden in der vorliegenden Arbeit die Bindungseigenschaften humaner ANCA und ihrer korrespondierenden F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmente untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, daß intakte humane ANCA und monoklonale Maus-Antikörper gegen PR3 an der Oberfläche geprimter Granulozyten binden. Diese Resultate befinden sich in Übereinstimmung mit Berichten aus der Literatur (Falk, 1990; Mulder, 1994; Porges, 1994).

Darüberhinaus wird in der vorliegenden Arbeit demonstriert, daß sowohl ANCA-F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmente als auch F(ab')<sub>2</sub> des monoklonalen anti-PR3-Antikörpers an TNF $\alpha$ -geprimte Granulozyten binden. Hieraus läßt sich eine Fc $\gamma$ -Rezeptor-unabhängige, Antigen-spezifische Bindung der ANCA erkennen. Die Tatsache, daß intakte humane ANCA eine höhere Bindung als ANCA-F(ab')<sub>2</sub>- und -Fab-Fragmente aufweisen, spricht für einen zusätzlichen Bindungs-Effekt, der durch die Interaktion von Fc-Teil und Fc $\gamma$ -Rezeptor vermittelt wird. Es werden drei Klassen von Fc $\gamma$ -Rezeptoren unterschieden. Neutrophile Granulozyten exprimieren die Fc $\gamma$ II- und Fc $\gamma$ III-Rezeptoren konstitutionell, während die Expression der Fc $\gamma$ I-Rezeptoren durch die Inkubation mit Interferon  $\gamma$  induziert wird. Daß die Interaktion von Fc-Teilen mit dem Fc $\gamma$ -Rezeptor tatsächlich stattfindet, allerdings alleinig nicht ausreicht, um die Zellen zu aktivieren, wird von unserer Beobachtung unterstützt, daß intakte Immunglobuline von Gesunden in der Durchflußzytometrie an

der Zelloberfläche binden, ohne jedoch eine Superoxid-Produktion auszulösen. Diese Immunglobuline von gesunden Kontrollen, nicht aber die der ANCA-Patienten, verlieren ihre Fähigkeit zu binden, wenn der Fc-Teil des Antikörper-Moleküls durch Pepsin-Verdau abgespalten wird. ANCA können also über die Ligation ihrer Ziel-Antigene eine zusätzliche, Fc $\gamma$ -Rezeptor-unabhängige Bindung eingehen.

Die hier vorgelegten Befunde zeigen, daß intakte humane PR3- und MPO-ANCA sowie murine monoklonale Antikörper gegen menschliche PR3 die Generation von Superoxid in TNF $\alpha$ -geprimten neutrophilen Granulozyten bewirken. Diese Antwort zeigt eine Dosis-Wirkungs-Beziehung. Unsere Resultate befinden sich in Übereinstimmung mit denen anderer Studien (Falk, 1990; Mulder, 1994; Reumaux, 1995; Porges, 1994). Wir präsentieren darüberhinaus Daten, die zeigen, daß F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente humaner ANCA TNF $\alpha$ -geprimte neutrophile Granulozyten in einer Dosis-abhängigen Weise aktivieren. Über die Aktivierung durch humane ANCA-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente existieren kontroverse Berichte. Während in zwei Untersuchungen humane ANCA-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente aktivierten (Falk, 1990; Keogan, 1992), konnten Mulder et al. (Mulder, 1994) und Remaux et al. (Reumaux, 1995) keine Auslösung einer Superoxid-Generation durch F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente heterologer anti-Laktoterrin-Antikörper und monoklonaler Antikörper gegen MPO und PR3 nachweisen. Die Diskrepanz könnte durch die unterschiedlichen Quellen der Antikörper bedingt sein: humane versus Maus versus Kaninchen. Für diese Möglichkeit spricht, daß auch wir keine Superoxid-Generation beobachteten, wenn F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente des monoklonalen Maus-Antikörpers gegen PR3 verwendet wurden. Daß F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente und nicht nur intakte Immunglobuline generell zu einer Aktivierung von Leukozyten führen können, ist bereits 1978 durch Ravid et al. demonstriert worden (Ravid, 1978). Die Untersucher inkorporierten synthetisch hergestellte Antigene in die Oberfläche von Lymphozyten und inkubierten die Zellen anschließend mit intakten Antikörpern oder F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten, die gegen diese Antigene gerichtet waren. Beide Präparationen, sowohl die kompletten Antikörper-Moleküle als auch die Fragmente lösten eine biologische Antwort aus. Die Studien von Ravid, aber auch die von Shen (Shen, 1995) zeigten darüber hinaus, daß die F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente interessanterweise bessere Aktivatoren als die intakten Antikörper waren. Auch wir fanden, daß bei drei unserer vier humanen ANCA-Präparationen die F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente eine höhere Superoxid-Produktion auslösten als die entsprechenden kompletten ANCA. Es werden Daten vorgelegt, die erstmals demonstrieren, daß die Papainspaltung von ANCA, die die Generation von ANCA-Fab bewirkt, zum Verlust der Aktivierung geprimter neutrophiler Granulozyten führt. Eine Aktivierung wurde allerdings dann initiiert, wenn diese gebundenen Fab-Fragmente auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten quervernetzt wurden. Dabei war es egal, ob die Quervernetzung mit F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten eines sekundären Antikörpers oder mit Hilfe des Biotin-Avidin-Systems durchgeführt wurde. Diese Resultate demonstrieren, daß der entscheidende Mechanismus für die ANCA-induzierte Aktivierung neutrophiler Granulozyten die Quervernetzung der ANCA-Ziel-Antigene auf der Zelloberfläche ist. Dieses Prinzip hat Parallelen in der Leukozytenbiologie. So war die Quervernetzung von Ziel-Antigenen, und nicht nur deren Ligation, ein notwendiger Schritt bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten über die Membranproteine CD43 (Kuijpers, 1992) und CD59 (Morgan, 1993).

Interessanterweise ist der Fc $\gamma$ -Rezeptor selbst ein solches Beispiel für die Neutrophilen-Aktivierung durch Quervernetzung (Huizinga, 1990; Crockett Torabi, 1990). Darüber hinaus führt auch die Quervernetzung von Oberflächenmolekülen in anderen Zelltypen zu biologischen Antworten, wie am Beispiel von CD53 auf B-Lymphozyten (Rasmussen, 1994) und von CD45 auf Killer-Zellen (Osterland, 1993) gezeigt werden konnte.

Verschiedene Untersucher haben vorgeschlagen, daß ANCA Granulozyten ausschließlich durch Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor-vermittelte Mechanismen aktivieren und daß F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente keine Rolle im Aktivierungsprozeß spielen (Mulder, 1994; Reumaux, 1995). Unsere Daten zeigen, daß der Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor für die Induktion der Stimulation nicht essentiell ist. Um zu untersuchen, ob dieser Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor möglicherweise einen modulierenden Effekt ausübt, haben wir den Rezeptor mit einem monoklonalen Antikörper geblockt. Die Blockade bewirkte eine Verminderung der Superoxid-Generation um 33%, wenn humane ANCA verwendet wurden und um 25%, wenn ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen humane PR3 eingesetzt wurde. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit denen von Porges et al., die monoklonale Maus-Antikörper gegen humane PR3 und MPO verwendeten und eine Verminderung der Superoxid-Produktion um 27% fanden (Porges, 1994). Der Effekt war davon abhängig, ob die neutrophilen Granulozyten den low-responder- oder den high-responder-Phänotyp des Fc $\gamma$ IIa-Rezeptors exprimierten. Im Gegensatz zu diesen und zu unseren Daten wurde in zwei Studien eine vollständige Inhibition der Superoxid-Antwort unter der Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor-Blockade gesehen (Reumaux, 1995; Mulder, 1994). Es kann keine schlüssige Erklärung für diese Diskrepanz gegeben werden. Es fällt allerdings auf, daß die Antikörper in den beiden letzten Studien eine eher schwache Aktivierung auslösten. Es ist vorstellbar, daß die Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor-Blockade effektiver ist, wenn nur eine geringe Aktivierung ausgelöst wird.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen darüberhinaus, daß sich monoklonale Maus-Antikörper gegen ANCA-Ziel-Antigene nicht analog zu humanen ANCA verhalten. Eine starke dosis-abhängige Antwort wurde erzielt, wenn TNF $\alpha$ -geprimte neutrophile Granulozyten mit intaktem monoklonalem Maus-Antikörper gegen PR3 inkubiert wurden. Im Gegensatz dazu induzierten F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente dieses Antikörpers keine Superoxid-Freisetzung. Auch der Versuch der Quervernetzung dieser Fragmente, die auf der Zelloberfläche gebunden hatten, konnte keine meßbare Antwort stimulieren. Diese Resultate unterscheiden sich von denen der humanen ANCA. Mögliche Erklärungen sind Differenzen in der Epitop-Spezifität zwischen den polyklonalen humanen und dem monoklonalen murinen Antikörper.

Es konnte zusammenfassend demonstriert werden, daß die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA von der Expression der ANCA-Ziel-Antigene auf der Zelloberfläche abhängt. Obwohl die Bindung der ANCA an ihre Ziel-Antigene für die Aktivierung notwendig ist, ist sie allein nicht ausreichend, um den Prozeß zu initiieren. Nur die Bindung, begleitet von einer effektiven Quervernetzung der präsentierten Antigene, bewirkt die Abgabe von Superoxid in neutrophilen Granulozyten. Der Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor ist für diesen Prozeß nicht essentiell, obwohl die Aktivierung der Zellen durch intakte ANCA durch die Interaktion mit diesem Rezeptor moduliert wird. Diese

Beobachtungen erweitern unser Verständnis der Mechanismen, durch welche ANCA zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten führen können.

## **4.2 Regulation der Apoptose neutrophiler Granulozyten**

Die Apoptose neutrophiler Granulozyten spielt eine kritische Rolle sowohl bei der Auslösung als auch bei der Unterhaltung und Auflösung inflammatorischer Reaktionen im Rahmen von ANCA-Vaskulitiden.

In der vorgelegten Arbeit wird gezeigt, daß die Translokation von ANCA-Antigenen aus den Granula auf die Zelloberfläche eine notwendige Voraussetzung für die nachfolgende Aktivierung der Zellen durch ANCA darstellt. Diese Translokation kann durch Zytokine vermittelt werden und wird als Priming bezeichnet. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Gilligan et al. zeigte, daß während der frühen Phase der spontanen Apoptose neutrophiler Granulozyten die Translokation von ANCA-Zielantigenen auf die Zelloberfläche erfolgt und daß humane ANCA ihre Zielantigene auf diesen Zellen erkennen und binden (Gilligan, 1996). Apoptose-assoziierte Vorgänge können somit das "klassische" Zytokinpriming ersetzen.

Schwere vaskuläre Läsionen bei ANCA-Vaskulitiden sind durch die Dominanz infiltrierender neutrophiler Granulozyten und Monozyten gekennzeichnet (Donald, 1976; Jennette, 1991). Die kritische Rolle der Apoptose neutrophiler Granulozyten für die Kontrolle und Auflösung von örtlichen Entzündungen inklusive der Glomerulonephritis und der renalen Vaskulitis ist gezeigt worden (Grigg, 1991; Savill, 1997; Hughes, 1997; Haslett, 1994). Apoptotische Granulozyten werden von Makrophagen erkannt und durch Phagozytose eliminiert. Hierdurch wird die Desintegration der Zellen mit der Konsequenz einer unkontrollierten Abgabe geweбетoxischer, entzündungsunterhaltender Substanzen verhindert (Haslett, 1994). Eine inadäquat verzögerte Apoptose würde zum Persistieren aktivierter Entzündungszellen führen. Im Gegensatz dazu könnte eine stark akzelerierte Apoptose den protektiven Phagozytose-Mechanismus überfordern. Beide Mechanismen wären pro-inflammatorisch und würden die Progression ANCA-positiver Erkrankungen fördern. Mechanismen der Regulation der Apoptose neutrophiler Granulozyten sind bisher unzureichend verstanden.

### **4.2.1 Die Rolle von Zytokinen**

Die Apoptose von neutrophilen Granulozyten wird durch lösliche Mediatoren, die während des Entzündungsprozesses freigesetzt werden, modifiziert. Es ist beschrieben worden, daß Substanzen wie GM-CSF, IL-1, IL-15, LPS und  $C_5$  in der Lage sind, Apoptose zu verzögern (Lee, 1993; Colotta, 1992; Cox, 1992; Girard, 1996), während die Aktivierung des Fas/Fas-Liganden-Systems zu einer akzelerierten Apoptose führt (Liles, 1996). ANCA-Vaskulitiden werden durch bakterielle Infekte begünstigt und sind durch ein zytokinreiches Milieu gekennzeichnet. So konnten im Blut und im Urin von Patienten mit aktiver ANCA-positiver Vaskulitis erhöhte Spiegel von  $TNF\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$  nachgewiesen werden (Tesar, 1998; Kekow, 1993). Darüberhinaus fand sich

bei *in situ*-Untersuchungen eine erhöhte mRNA- und Protein-Expression von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Interferon  $\gamma$  und transforming-growth-factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) innerhalb der aktiven Läsionen bei Patienten mit ANCA-positiver Glomerulonephritis (Noronha, 1993; Waldherr, 1993). Diese Daten demonstrieren, daß insbesondere lokal, im betroffenen Gewebe, hohe Konzentrationen an Zytokinen erreicht werden. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir den Effekt der krankheitsrelevanten Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-8 und des bakteriellen Peptids FMLP auf die Apoptose neutrophiler Granulozyten. Diese Mediatoren wurden auf Grund ihrer Relevanz für die ANCA-Vaskulitiden ausgewählt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß Zytokine, die während der lokalen Entzündung generiert werden, den programmierten Zelltod neutrophiler Granulozyten modulieren.  $\text{TNF}\alpha$  und FMLP führten zu einer Akzeleration der konstitutiven Apoptose. Während die konstitutive und die FMLP-assoziierte Apoptose durch Superoxid vermittelt wurden, konnte ein solcher Zusammenhang für die  $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu bewirkte IL-8 eine Verzögerung sowohl der spontanen als auch der  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Apoptose, wodurch der interaktive Apoptose-regulierende Effekt der Zytokine nachgewiesen wurde.

$\text{TNF}\alpha$  bewirkt eine rapide einsetzende Akzeleration der Apoptose. Dieser Effekt trat bereits zwischen der ersten und der zweiten Stunde der Inkubation auf und wies keine Abhängigkeit von der Superoxidproduktion auf. Diese Aussage wird durch mehrere Befunde gestützt. Erstens trat die Steigerung der Apoptose auch dann ein, wenn eine  $\text{TNF}\alpha$ -Dosis verwendet wurde, die in den parallel durchgeführten Aktivierungsstudien zu keiner Induktion einer Superoxid-Generation führte. Zweitens inhibierte exogene Superoxiddismutase, die die spontane und die FMLP-induzierte Apoptose hemmte, nicht die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Beschleunigung der Apoptose.  $\text{TNF}\alpha$  führte darüber hinaus zu keiner veränderten Expression der endogenen Mn-Superoxid-Dismutase. Wir konnten drittens zeigen, daß auch neutrophile Granulozyten eines Patienten mit einem genetisch determinierten Defekt im NADPH-Oxidase-System (chronic granulomatous disease, CGD) mit einer akzelerierten Apoptose auf die Behandlung mit  $\text{TNF}\alpha$  reagieren, während diese Zellen auch nach Stimulation kein Superoxid generierten.

Es war für viele Jahre akzeptiert, daß  $\text{TNF}\alpha$ -Zytotoxizität normale Zellen ausspart und nur einige transformierte Zell-Linien betrifft. Erstmals wurde von Laster et al. gezeigt, daß  $\text{TNF}\alpha$  Apoptose induzieren kann und daß die Form des Zelltodes, also apoptotisch versus nicht-apoptotisch, unter verschiedenen ausgetesteten Fibroblasten-Linien differierte (Laster, 1988). Später wurde demonstriert, daß  $\text{TNF}\alpha$  auch in Primärkulturzellen wie Endothelzellen, Hepatozyten und T-Lymphozyten Apoptose auslösen kann (Robaye, 1991; Polunovsky, 1994; Shinagawa, 1991; Zheng, 1995). Unsere Ergebnisse zeigen, daß  $\text{TNF}\alpha$  eine rapide auftretende Apoptose in neutrophilen Granulozyten induziert. Wir befinden uns dabei in Übereinstimmung mit Berichten von Takeda et al. (Takeda, 1993). Im Gegensatz zu unseren und Takeda's Befunden wurden von Colotta et al. Ergebnisse veröffentlicht, die eine Verzögerung der Apoptose durch  $\text{TNF}\alpha$  demonstrieren (Colotta, 1992). Diese Studie analysierte die Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  auf die Apoptose allerdings zu einem viel späteren Zeitpunkt, nämlich nach 48 und 72 Stunden. Frühere Zeitpunkte,

wie in den hier vorgelegten Untersuchungen, wurden nicht berücksichtigt. Interessanterweise zeigen unsere Befunde, daß sich nach der initialen Akzeleration der Apoptose durch  $\text{TNF}\alpha$  keine Unterschiede im Prozentsatz apoptotischer Zellen nach 24 Stunden ergeben. Betrachtet man die Ergebnisse beider Studien im Zusammenhang, ergibt sich die Möglichkeit, daß nur eine Subpopulation neutrophiler Granulozyten für die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Apoptose empfänglich ist. Diese Erklärung könnte für die scheinbare Diskrepanz zwischen unseren und Colotta's Befunden verantwortlich sein.

Es ist gezeigt worden, daß Sauerstoffradikale Apoptose vermitteln können. *In vitro*-Untersuchungen mit Nervenzellen (Greenlund, 1995; Hockenbery, 1993) und Lymphozyten (Hockenbery, 1993; Sandstrom, 1994) haben bewiesen, daß intrazellulär generiertes Superoxid eine wichtige Rolle für den programmierten Zelltod spielt. Zellkulturbedingungen, die den oxidativen Streß erhöhen, steigern auch die Apoptoserate. Beispiele hierfür sind ein hoher Sauerstoffpartialdruck (Enokido, 1993), die Verarmung an Nerven-Wachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) (Greenlund, 1995), Diäthyl-Maleat (Kane, 1993) und  $\beta$ -Amyloid (Loo, 1993). Auch *in vivo* scheinen Sauerstoffradikale mit Apoptose assoziiert zu sein. Die familiäre amyotrophe Lateralsklerose ist eine fatale Erkrankung, die durch den apoptotischen Tod von motorischen Neuronen gekennzeichnet ist. Patienten mit dieser Krankheit haben eine Mutation der Kupfer/Zink-Superoxiddismutase (Rosen, 1993; Deng, 1993). Ein weiteres Argument für eine kritische Rolle von Sauerstoffradikalen beim programmierten Zelltod stellt die Tatsache dar, daß Bcl-2 vor dem Sauerstoffradikal-vermittelten Zelltod schützt (Reed, 1994). Es wurde gezeigt, daß diese Wirkung sowohl durch eine direkte Reduktion von Sauerstoffradikalen als auch durch eine Unterdrückung ihrer biologischen Wirkungen bedingt wird (Hockenbery, 1993; Kane, 1993). Das Bcl-2-Protein ist in den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran lokalisiert (Hockenbery, 1990; Jacobson, 1993; Monaghan, 1992). Alle drei Orte enthalten Elektronentransport-Ketten, die für die Generation von reaktiven Sauerstoffradikalen notwendig sind. Wir und andere Arbeitsgruppen haben gefunden, daß humane neutrophile Granulozyten kein Bcl-2-Protein exprimieren (Iwai, 1994). Das Fehlen von Bcl-2 könnte zur hohen konstitutiven Apoptose-Rate und somit zur kurzen Lebensspanne neutrophiler Granulozyten beitragen. Die Beobachtung, daß eine Überexpression von Bcl-2 in transgenen Tieren zu einer verlängerten Lebensspanne von Granulozyten führt, unterstützt diese Hypothese (Lagasse, 1994).

Im Gegensatz zu den Befunden bei der  $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Apoptose zeigen unsere Untersuchungen, daß das unstimulierte Altern neutrophiler Granulozyten in der Kultur zur konstitutiven Apoptose führt und daß dieser Vorgang durch oxidativen Streß vermittelt wird. Unter diesen Bedingungen konnte durch exogene Superoxid-Dismutase eine Dosis-abhängige Suppression der Apoptose bewirkt werden. Am Beispiel des bakteriellen Peptids FMLP wurde demonstriert, daß eine stimulierte Superoxidgeneration die spontane Apoptose akzelerieren kann.

In nachfolgenden Experimenten wurde Interleukin-8 als ein weiteres für die ANCA-Vaskulitiden relevantes Zytokin ausgewählt, um den Effekt auf die Apoptose neutrophiler Granulozyten zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Prototyp eines chemotaktischen Zytokins den programmierten Zelltod beeinflusst, indem es zu einer Verzögerung sowohl der spontanen als auch

der  $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Apoptose führt. Dieser Effekt ist Zeit- und Dosis-abhängig und wird durch beide Typen von IL-8-Rezeptoren vermittelt. Der Apoptose-hemmenden Wirkung von IL-8 liegt keine Hochregulation der Bcl-2-Expression zugrunde.

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ist ein kritisches Ereignis für die Bekämpfung von Entzündungen und die Aufrechterhaltung der Integrität des Wirtsorganismus. Diese Rekrutierung erfolgt durch Chemotaxis und kann durch Zytokine mit chemotaktischen Eigenschaften, den Chemokinen, vermittelt werden. Interleukin-8 gehört zur Gruppe der  $\alpha$ -Chemokine, deren Wirkung sich hauptsächlich auf neutrophile Granulozyten richtet (rev. in Miller, 1992; Oppenheim, 1991; Ahuja, 1994; Baggiolini, 1994). Sie bestehen aus 70-80 Aminosäuren und enthalten 4 konservierte Cysteine. Die ersten beiden Cysteine sind durch eine variable Aminosäure getrennt (CXC). Mehr als 12 Mitglieder dieser Familie, darunter das Growth-Related Protein  $\alpha$  ( $\text{Gro}\alpha$ ), sind beschrieben. IL-8 wird durch Endothelzellen, Mesangiumzellen und neutrophile Granulozyten produziert (Baggiolini, 1994; Hoch, 1996). Proteinase-3, die von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird und eines der Haupt-Antigen der ANCA ist, stimuliert die IL-8 Produktion durch Endothelzellen (Berger, 1996). Tatsächlich sind erhöhte Konzentrationen von IL-8 bei Patienten mit aktiver ANCA-Vaskulitis beschrieben worden (Tesar, 1998). Diese Befunde weisen darauf hin, daß während der Inflammation ein IL-8-reiches Milieu geschaffen wird.

Neutrophile Granulozyten zeigen verschiedene biologische Antworten auf eine Stimulation mit IL-8. Hierzu gehören die gerichtete Migration, eine Veränderung der Zellgestalt (sog. shape change) (Wymann, 1987), die Degranulation (Masure, 1991), die Aktin-Polymerisation (Westlin, 1992) und die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (Detmers, 1990). Wir beschreiben eine weitere Wirkung von IL-8, nämlich die Verzögerung des programmierten Zelltodes. Unsere Ergebnisse demonstrieren eine klare Dosis- und Zeit-abhängige Verzögerung der spontanen Apoptose. Im Gegensatz dazu fanden zwei weitere Studien keinen Effekt von IL-8 auf die Apoptose (Cox, 1992; Colotta, 1992). Beide Studien verwendeten mit 48 und 72 Stunden deutlich längere Inkubationszeiten und untersuchten nicht die Wirkung innerhalb der ersten 30 Stunden. Es ist vorstellbar, daß für Granulozyten mit ihrer kurzen Lebensspanne frühe Zeitpunkte von höherer biologischer Relevanz sind, da nach 48 Stunden Monozyten und andere einwandernde Zellen das Entzündungsgeschehen dominieren. Während der Entzündung geben aktivierte Leukozyten proinflammatorische Mediatoren wie  $\text{TNF}\alpha$  ab. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang unsere Resultate, die zeigen, daß IL-8 nicht nur die spontane, sondern auch die  $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose hemmt. Mit einer Verzögerung der Apoptose wird die Lebensspanne neutrophiler Granulozyten verlängert. Diese Zellen sind somit über einen längeren Zeitraum in der Lage, ihre Effektor-Funktionen auszuüben und dabei Sauerstoffradikale zu generieren, zu phagozytieren oder mit der Freisetzung proteolytischer Enzyme zu reagieren. IL-8 würde damit über zwei verschiedene Wege zur Akkumulation neutrophiler Granulozyten am Entzündungsort führen: zum einen über den chemotaktischen Effekt, zum anderen über eine Verlängerung der Lebensspanne der Zellen.



Neutrophile Granulozyten exprimieren zwei CXC-Rezeptor-Typen, nämlich IL-8 RI und IL-8 RII. Der IL-8 RII besitzt eine hohe Affinität gegenüber allen Mitgliedern der CXC-Zytokin-Familie, einschließlich Gro $\alpha$ , während der IL-8 RI nur IL-8 mit hoher Affinität bindet (Moser, 1991; Lee, 1992). In den von uns durchgeführten Untersuchungen zur Rolle beider IL-8-Rezeptoren bei der Vermittlung des Apoptose-verzögernden Effektes zeigte sich, daß IL-8 einen stärkeren Effekt auf die Apoptose ausübt als TNF $\alpha$ . Die Aktivierung des IL-8 RII vermittelt also eine Verzögerung der Apoptose, und die zusätzliche Aktivierung des IL-8 Typ-I-Rezeptors führt zu einer Verstärkung dieses Effektes. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Beispielen von anderen biologischen Antworten neutrophiler Granulozyten auf eine IL-8 Stimulation. So führt IL-8, verglichen mit Gro $\alpha$ , auch zu einer verstärkten Hochregulation des Integrins CD11 $\beta$ , einer erhöhten Phospholipase-D-Aktivierung, einer stärkeren Freisetzung von intrazellulärem Kalzium und einer ausgeprägteren chemotaktischen Wirkung (Geiser, 1993; L'Heureux, 1995).

Die Verzögerung der Apoptose durch IL-8 wird nicht über die Expression von Bcl-2 vermittelt. Wir zeigen in Übereinstimmung mit der Literatur, daß Bcl-2 in frisch isolierten neutrophilen Granulozyten nicht nachweisbar ist (Delia, 1992; Iwai, 1994). Darüber hinaus können wir demonstrieren, daß auch die Behandlung mit IL-8, weder auf der mRNA- noch auf der Proteinebene, zu einer induzierten Expression von Bcl-2 führt. Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen des Apoptose-verzögernden Effektes von IL-8 bleiben unklar und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Diese Untersuchungen zeigen, daß Zytokine, die während der lokalen Entzündung generiert werden, den programmierten Zelltod neutrophiler Granulozyten modulieren. Die Balance zwischen Apoptose-akzelerierenden und Apoptose-verzögernden Effekten und die Wechselwirkung mit dem Phagozytosesystem, das die apoptotischen Granulozyten beseitigt, besitzen somit eine zentrale Bedeutung für eine kontrollierte und effektive Entzündungsreaktion. Störungen dieser Homöostase können zur Entstehung und Unterhaltung von inflammatorischen Reaktionen, wie sie die ANCA-Vaskulitis darstellt, beitragen.

#### 4.2.2 Differenziell exprimierte Proteine bei der Apoptose

Apoptose ist die programmierte Form des Zelltodes, und ihre Bedeutung für physiologische und pathologische Prozesse ist etabliert. Die intrazellulären Ereignisse, die Apoptose regulieren, sind bisher wenig verstanden. Es wurden Untersuchungen durchgeführt, um Kandidaten-Proteine zu identifizieren, die für das Überleben der Zellen eine kritische Bedeutung besitzen. Dazu wurde eine hochreine Population neutrophiler Granulozyten präpariert. Diese Zellen unterzogen sich in der unstimulierten *in vitro*-Kultur einer konstitutiven Apoptose. Nach der Separation apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen wurden die Protein-Expressionsmuster in der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert. Mit Hilfe der Proteinsequenzierung konnten 5 Proteine identifiziert werden, die in nicht-apoptotischen Zellen hochreguliert und in apoptotischen Zellen vermindert exprimiert wurden. Es handelt sich um Aktin, Myeloid-Related Protein-8 und 14 (MRP-8, MRP-14) sowie um  $\alpha$ -Enolase und Katalase.

Humane neutrophile Granulozyten haben eine kurze Lebenszeit und eine hohe Bildungsrate. Etwa  $10^{11}$  Granulozyten werden täglich aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation ausgeschüttet (Athens, 1961). Die Lebensspanne wird durch den Einfluß verschiedener extrazellulärer Signale reguliert. Apoptose spielt hierbei eine zentrale Rolle. Humane neutrophile Granulozyten von gesunden Spendern unterziehen sich der spontanen Apoptose, wenn sie unter günstigen Bedingungen wie physiologischem pH, Anwesenheit von Serum etc, kultiviert werden (Savill, 1989). Für diese konstitutive Apoptose sind keine externen Stimuli notwendig. Es entwickeln sich die von Kerr et al. charakterisierten typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose (Kerr, 1972), die wir in unseren Untersuchungen ausführlich beschrieben haben. Bei der Kultivierung lassen sich über einen Beobachtungszeitraum von 24 Stunden weder signifikante Zellverluste noch wesentliche Zellnekrosen nachweisen. Wir bevorzugten dieses Apoptose-Modell gegenüber Modellen der stimulierten Apoptose. In einer Reihe von Untersuchungen wurden mehr oder weniger physiologische Stimuli zur Induktion der Apoptose verwendet. Dieses Vorgehen macht es schwierig, die beobachteten intrazellulären Ereignisse als Apoptose-assoziiert einzuordnen. Strukturelle und funktionelle Veränderungen können in solchen Systemen Stimulus-spezifisch und dabei aber Apoptose-unabhängig auftreten.

Um tatsächlich die Proteinexpression neutrophiler Granulozyten zu untersuchen und nicht die kontaminierender Zellen, haben wir eine hoch-reine Präparation hergestellt. Konventionelle Dichte-Gradienten-Techniken ergeben Präparationen neutrophiler Granulozyten, die mit Eosinophilen kontaminiert sind. Wir fanden 4,1% Eosinophile in unseren Präparationen und konnten diesen Anteil durch die Anwendung des magnetischen Sortings auf ca 1% reduzieren. Wir befinden uns damit in Übereinstimmung zu den in der Literatur veröffentlichten Daten (Martin, 1997; Zahler, 1997). Nach einer Inkubation der neutrophilen Granulozyten für 24 Stunden erfolgte in einem zweiten Schritt die Trennung apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen mit Hilfe eines diskriminierenden Antikörpers und magnetischer Teilchen. Die Verwendung eines Antikörpers gegen den FcγIII-Rezeptor (CD16) zur Unterscheidung apoptotischer und nicht-apoptotischer neutrophiler Granulozyten ist bereits von anderen Gruppen berichtet worden (Dransfield, 1994; Rossi, 1995; Homburg, 1995). Auf diese Weise wurde eine Anreicherung beider Sub-Populationen auf über 90% bewirkt. Die Protein-Expressionsmuster frisch isolierter neutrophiler Granulozyten sowie kultivierter nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen wurden mit der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert. Neutrophile Granulozyten müssen Proteine neu synthetisieren, um zu überleben. Hemmer der mRNA- und der Protein-Synthese führen zu einer Beschleunigung der basalen Apoptose (Cox, 1997). Aus diesem Grund interessierten wir uns besonders für solche Proteine, die nach der Kultivierung in den nicht-apoptotischen Zellen stärker exprimiert waren als in den frisch isolierten Zellen und die andererseits in den apoptotischen Zellen vermindert waren. Mit Hilfe verschiedener Proteinsequenzierungstechniken identifizierten wir Aktin, MRP-8, MRP-14,  $\alpha$ -Enolase und Katalase.

Aktin ist ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts neutrophiler Granulozyten und besitzt Bedeutung für eine Reihe zellulärer Funktionen, wie Zell-Motilität, die Fähigkeit zur Adhäsion, Phagozytose und Veränderungen der Zell-Gestalt (shape change) (rev. in Howard, 1994). Die Studien von Whyte et

al. haben demonstriert, daß neutrophile Granulozyten im Prozeß der Apoptose wichtige Zytoskelett-Funktionen verlieren, wie die Fähigkeit, ihre Gestalt zu ändern (shape change), zu degranulieren und auf chemotaktische Reize zu migrieren (Whyte, 1993). Es ist kürzlich gezeigt wurden, daß Aktin ein *in vitro*-Substrat für Caspasen darstellt (Mashima, 1997; Kayalar 1996). Caspasen sind Zystein enthaltende, Aspartat-spezifische Proteasen, die in der Ausführung der Apoptose eine zentrale Rolle spielen (reviewed in Thompson, 1995; Alnemri, 1996; Martin, 1995; Yuan, 1993). Über die Rolle der Caspasen für die *in vivo* -Prozessierung von Aktin existieren widersprüchliche Daten (Song, 1997; Mashima, 1997). Brown et al. fanden während der spontanen Apoptose neutrophiler Granulozyten eine Verminderung der Expression von Membran-assoziiertem Aktin und das gleichzeitige Auftreten von Aktinfragmenten (Brown, 1997). Sie konnten zeigen, daß Aktin dabei kein direktes Substrat für ICE-ähnliche Caspasen war. Die Hemmung von Calpain führte zu einer gleichzeitigen Inhibierung der Aktinspaltung und der Apoptose. Während die Untersuchungen von Brown et al. an einer gemischten Population apoptotischer und nicht-apoptotischer neutrophiler Granulozyten durchgeführt wurde, konnten wir durch die getrennte Analyse beider Populationen erstmals eindeutig demonstrieren, daß intaktes Aktin in nicht-apoptotischen Zellen erhöht und in apoptotischen Zellen deutlich vermindert war. Unsere Befunde schlagen die Möglichkeit vor, daß der beobachtete Verlust an intaktem Aktin für den Verlust von Zytoskelett-Funktionen in apoptotischen neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist. Ob Aktin über die Vermittlung der Zytoskelett-Funktionen hinaus eine Bedeutung für die Regulation der Apoptose besitzt, ist bisher nicht geklärt. Durch Girard et al. konnte gezeigt werden, daß Interleukin-4 und Interleukin-15 die de-novo-Synthese von Aktin induzieren und gleichzeitig die Apoptose neutrophiler Granulozyten verzögern (Girard, 1996; Girard, 1997). Die Tatsache, daß die Überexpression von Gelsolin, einem Aktin-regulierenden Protein, zur Hemmung der Apoptose führte, ist eine weitere Beobachtung, die unterstreicht, daß Aktin eine wichtige Rolle im Prozeß der Apoptose spielt (Ohtsu, 1997; Kothakota, 1997).

Es konnte in unseren Untersuchungen gezeigt werden, daß MRP-8 und MRP-14, zwei Calcium-bindende Proteine, mit einer hohen Expression in nicht-apoptotischen und einer geringen Expression in apoptotischen neutrophilen Granulozyten vorkommen. MRP-8 wurde verschiedentlich auch als L1 light chain, zystische Fibrose-Antigen (CFA), Calgranulin A oder p8 bezeichnet und MRP-14 als L1 heavy chain, Calgranulin B oder p14 (reviewed in Hessian, 1993). Beide Proteine formen *in vivo* heterodimerische Komplexe, Calprotectin genannt, und machen etwa 45% des zytosolischen Proteins von neutrophilen Granulozyten und etwa 1% von Monozyten aus (Edgeworth, 1991). MRP-8 und MRP-14 werden Zell-spezifisch in neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert und lassen sich nicht in anderen Zellen der hämatopoetischen Linie (Zwadlo, 1986) nachweisen. Obwohl in den letzten Jahren eine Reihe von Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Proteine durchgeführt wurden, sind die biologischen Funktionen letztlich bisher nicht geklärt. Die existierenden Daten zeigen, daß MRP-8 und MRP-14 Casein-Kinase I und II (CKII) inhibieren, die wiederum die RNA-Polymerase-Aktivität regulieren (rev. in Hessian, 1993). Es wurde spekuliert, daß die Blockierung von CKII über eine Limitierung der metabolischen Aktivität für die kurze Lebensspanne der terminal differenzierten neutrophilen Granulozyten

bedeutsam sein könnte. Für eine Rolle bei der Reifung myeloischer Zellen spricht auch die Tatsache, daß MRP-8 und MRP-14 in der Promyelozyten-Linie HL-60 nur gering exprimiert sind und bei der Differenzierung dieser Zellen zu neutrophilen Granulozyten hochreguliert werden (Koike, 1992). Weitere biologische Effekte umfassen die Chemotaxis, die Steigerung der Zell-Adhäsion, die Hemmung der Gerinnungskaskade, eine antimikrobielle sowie eine wachstumshemmende Wirkung (Hessian, 1993; Yen, 1997; Murthy, 1993; Newton, 1998). Es wird darüber hinaus angenommen, daß MRP-8 und MRP-14 neben intrazellulären auch extrazelluläre Wirkungen besitzen. Beide Proteine co-lokalisieren mit Filamenten des Zytoskeletts (Roth, 1993), können während der Zell-Aktivierung zur Plasmamembran translozieren (Lemarchand, 1992) oder auch in den extrazellulären Raum sezerniert werden (Rammes, 1997; Lugering, 1997). Es konnte demonstriert werden, daß MRP-8/MRP-14-Komplexe den apoptotischen Zelltod in einer Leukämie-Linie induzieren können (Yui, 1997). Wir fanden eine hohe Expression von MRP-8 und MRP-14 in nicht-apoptotischen und eine geringe Expression in apoptotischen neutrophilen Granulozyten. Es wäre denkbar, daß MRP-8 und MRP-14 von einer Subpopulation von Zellen abgegeben werden und durch einen autokrinen Mechanismus die Apoptose begünstigen. Die präzise Bedeutung der von uns beobachteten differentiellen intrazellulären Expression für die Regulation der Apoptose neutrophiler Granulozyten muß in weiteren Studien definiert werden.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde Katalase als ein weiteres Protein identifiziert, das während der spontanen Apoptose neutrophiler Granulozyten differentiell exprimiert wird. Eine erhöhte Katalase-Expression war in den nicht-apoptotischen Zellen zu beobachten, während eine geringe Expression in apoptotischen Zellen nachweisbar war. Katalase wirkt als Antioxidanz und spielt eine Rolle in der Homöostase des intrazellulären Redoxpotentials. Reaktive Sauerstoffradikale agieren als wichtige Mediatoren der Schädigung von Zellen. Verschiedene intrazelluläre Schutzmechanismen sind darauf ausgerichtet, die Produktion und die biologischen Effekte schädigender Oxidantien zu unterdrücken. Beispiele solcher Schutzmechanismen sind Enzyme wie Superoxiddismutase, Glutathion-Peroxidase und die bereits erwähnte Katalase. Darüberhinaus sind in den Zellmembranen verschiedene Antioxidantien lokalisiert, einschließlich Vitamin E und Quinone (Coenzym Q), während Vitamin C und Glutathione als wasserlösliche Antioxidanzien im Zytoplasma zu finden sind (rev. in Kroemer, 1995). In den letzten Jahren wurde erkannt, daß auch die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 über Effekte auf Sauerstoffradikale vermittelt wird (Reed, 1994). Es ist an Orten nachweisbar, die Elektronentransport-Ketten enthalten, die für die Generation von reaktiven Sauerstoffradikalen notwendig sind (Hockenbery, 1990; Jacobson, 1993; Monaghan, 1992). Oxidativer Streß als Auslöser der Apoptose ist inzwischen in verschiedenen Zelltypen demonstriert worden (Greenlund, 1995; Hockenbery, 1993; Sandstrom, 1994; Enokido, 1993; Kane, 1993; Loo, 1993). In unseren Untersuchungen konnte die Bedeutung reaktiver Sauerstoffradikale bei der Apoptose neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden, diese Ergebnisse wurden bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert. Eine Rolle von Wasserstoffperoxid bei der Vermittlung der Apoptose ist in verschiedenen Zellen, wie in Lymphozyten (Wesch, 1998; Furuke, 1997), humanen Mesangiumzellen (Sugiyama, 1996) und glatten Gefäßmuskelzellen (Li, 1997), demonstriert worden. Katalase bewirkt den Abbau von

Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser und besitzt somit eine potentielle anti-apoptotische Wirkung. Tatsächlich haben Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten gezeigt, daß die Stimulation mit Immunkomplexen zu einer Beschleunigung der Apoptose führte und daß dieser Effekt durch Katalase verhindert werden kann (Gamberale, 1998). Die Inhibition der spontanen Apoptose neutrophiler Granulozyten durch Katalase wurde in zwei weiteren Untersuchungen demonstriert (Hannah, 1995; Kasahara, 1997). Unsere Ergebnisse zeigen eine erhöhte Katalase-Expression in den nicht-apoptotischen Zellen, während nur eine geringe Expression in apoptotischen Zellen beobachtet werden konnte. Eine hohe Expression dieses Enzyms stellt, im Einklang mit den Berichten aus der Literatur, einen wirksamen Schutz vor Oxidantien dar und hat somit anti-apoptotische Wirkung. Unsere Untersuchungen schlagen vor, daß die intrazelluläre Expression von Katalase einen wichtigen Mechanismus für die Regulation der Apoptose neutrophiler Granulozyten darstellt.

#### 4.2.3 Die Bedeutung von extrazellulären Matrix-Proteinen

Neutrophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden. Während der vaskulitischen Entzündungsreaktion verlassen neutrophile Granulozyten den Blutstrom und dominieren das frühe perivaskuläre Infiltrat (Donald, 1976; Jennette, 1991). Auf diesem Wege kommt es zum Kontakt mit extrazellulären Matrixproteinen. In den hier vorgelegten Untersuchungen wurde die Hypothese getestet, daß die Interaktion der Neutrophilen mit der Matrix zu einer Akzeleration der Apoptose führt. Die Resultate zeigen, daß extrazelluläre Matrix eine Steigerung der  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Apoptose bewirkt, während das spontane Apoptoseverhalten nicht signifikant beeinflusst wird. Studien zur intrazellulären Signaltransduktion demonstrierten eine kritische Rolle der Tyrosin-Phosphorylierung bei der Akzeleration der  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Apoptose durch Fibronektin. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte demonstriert werden, daß die höchste Tyrosin-Phosphorylierung in den Kontaktstellen der Zellen mit der Matrix (focal adhesion sites) und im Zytoplasma auftrat. Wir identifizierten erstmalig Ly-GDI, einen Regulator von kleinen g-Proteinen der Ras-Superfamilie, als ein Substrat der Tyrosin-Phosphorylierung. Wir zeigen, daß Ly-GDI durch  $\text{TNF}\alpha$  gespalten wird und daß diese Spaltung durch Fibronektin verstärkt wurde. Die spezifische Hemmung von Caspase-3 verhinderte die Spaltung von Ly-GDI und verminderte gleichzeitig die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Apoptose.

Akute Entzündungen führen zur Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Es kommt zur Adhäsion neutrophiler Granulozyten an das Endothel und zur nachfolgenden Transmigration in den perivaskulären Raum. Auf diesem Wege vollziehen sich vielfältige Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten und extrazellulären Matrixproteinen. Diese Interaktionen können die Funktion neutrophiler Granulozyten beeinflussen. So konnte eine Steigerung der Produktion von Sauerstoffradikalen, der Phagozytose und der Degranulation neutrophiler Granulozyten durch die Adhäsion demonstriert werden (Nathan, 1989; Richter, 1990; Brown, 1988; Wade, 1983). Apoptose ist ein zentraler Mechanismus, der zur Auflösung örtlicher Entzündungen führt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Adhäsion an Endothelzellen (Ginis, 1997), die transendotheliale Migration (Watson, 1997) und der Kontakt zu Thrombozyten

(Andonegui, 1997) das Apoptoseverhalten neutrophiler Granulozyten beeinflussen. Wir zeigen erstmals, daß die  $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose durch den Kontakt der neutrophilen Granulozyten mit extrazellulären Matrixsubstanzen wie Fibronectin, Kollagen Typ I und Typ IV sowie Laminin akzeleriert wird. An Hand von Fibronectin konnte demonstriert werden, daß dieser Effekt nur durch die Interaktion mit immobilisierter Matrix auftrat, nicht aber, wenn neutrophile Granulozyten in Suspension mit löslichem Fibronectin, wie es im Plasma vorkommt, reagierten. Um dieses Phänomen besser zu verstehen, führten wir Untersuchungen zur Signaltransduktion durch. Die Signaltransduktion der Apoptose in neutrophilen Granulozyten ist bisher nur unzureichend verstanden. Eine kritische Rolle von PKC (Adachi, 1994) und Protein-Tyrosin-Phosphorylierung (Yousefi, 1994) (Downey, 1998) ist bei der Hemmung der Apoptose durch GM-CSF gezeigt wurden. Auch die durch Ligation des Fas-Rezeptors stimulierte Apoptose konnte durch Blockierung der Tyrosin-Phosphorylierung inhibiert werden (Liles, 1996). Unsere Ergebnisse demonstrieren die kritische Rolle der Tyrosin-Phosphorylierung bei der Fibronectin-vermittelten Akzeleration der  $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Apoptose in neutrophilen Granulozyten. Die Kultivierung der Zellen auf Fibronectin, gefolgt von der Behandlung mit  $\text{TNF}\alpha$ , führte zu einem signifikanten Anstieg der Adhäsion und des Zell-Spreadings. Wir fanden eine stark erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung in den Kontaktstellen zwischen adhätierenden Zellen und Matrixsubstanz, den sog. focal adhesion sites. Interessanterweise konnte dabei beobachtet werden, daß Genistein sowohl das Zellspeading als auch die Fibronectin-vermittelte Akzeleration der Apoptose inhibierte. Nachfolgende Versuche waren auf die Identifizierung von Substraten der Tyrosin-Phosphorylierung gerichtet. Es wurde nachgewiesen, daß die Interaktion von Fibronectin mit  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten neutrophilen Granulozyten zum Auftreten neuer Tyrosin-phosphorylierter Proteinbanden im Western-Blot führte. Durch den Einsatz der 2D-Gelelektrophorese und der Proteinsequenzierung konnte Ly-GDI als ein wichtiges Substrat dieser Tyrosin-Phosphorylierung identifiziert werden. Ly-GDI oder auch D4-GDI ist ein Protein mit einer Größe von 27 kDa. Ly-GDI reguliert über die Hemmung der Dissoziation von GDP den Aktivitätsstatus von GTP-Bindungsproteinen der Ras-Superfamilie. Ras-Proteine sind aktiv, wenn sie mit GTP besetzt sind und inaktiv, wenn GDP gebunden ist (Joneson, 1997; Quinn, 1995; Bokoch, 1993). Die spezifischen Proteine, die mit Ly-GDI *in vivo* stabile Komplexe formen, sind bisher nicht charakterisiert. Es wurde berichtet, daß Ly-GDI durch PMA-Stimulation der Zellen phosphoryliert wird (Scherle, 1993; Gorvel, 1998). Diese Phosphorylierung fand vorwiegend an Threonin-Resten statt (Scherle, 1993). Unsere Daten zeigen eine Matrix-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung von Ly-GDI in  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten neutrophilen Granulozyten. Die Aminosäuresequenz zeigt 7 Tyrosine an den Positionen 24, 48, 107, 125, 130, 146 und 172. Es wird spekuliert, daß die Phosphorylierung zu einer Verbesserung des Transfers von Ly-GDI-Komplexen zur Zellmembran führt (Gorvel, 1998). Die Charakterisierung der Tyrosinkinase, die zur Phosphorylierung von Ly-GDI führt, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit  $\text{TNF}\alpha$  bewirkt eine progressive, zeitabhängige Spaltung von intaktem Ly-GDI, wobei ein 23-kDa-Spaltprodukt generiert wird. Ly-GDI weist zwei Angriffsstellen für Caspasen auf. Die Rolle dieser Cystein-enthaltenden Aspartat-spezifischen

Proteasen (Caspasen) in der Ausführung der Apoptose ist in verschiedenen Systemen gezeigt worden. Caspase-3 (CPP32, Apopain, YAMA) spaltet intaktes Ly-GDI an der Spaltstelle DDDELD<sup>19</sup>SKLN und generiert dabei ein 23-kDa-Fragment, wohingegen Caspase-1 die LLGD<sup>55</sup>G Stelle spaltet, wodurch ein 19-kDa-Fragment entsteht (Na, 1996; Danley, 1996). Caspase-3 als wichtiges Mitglied der Cystein-Proteasen spielt eine Schlüsselrolle in der Ausführung der Apoptose. Das Enzym prozessiert Mitglieder seiner eigenen Familie, aber auch eine Reihe anderer Targetproteine, einschließlich Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) (Kaufmann, 1993), FAK p125 (Wen, 1997), Laminin B1 (Neamati, 1995), Topoisomerase 1 (Voelkel Johnson, 1995), U1-RNP (Casciola Rosen, 1994), DNA-dependent protein kinase (Casciola Rosen, 1995), zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (Wissing 1997), Proteinkinase C delta (Emoto, 1995), Gelsolin (Kothakota, 1997) und p21 aktivierte Kinase-2 (Rudel, 1997). Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit TNF $\alpha$  zur Spaltung von intaktem Ly-GDI führt und daß diese Spaltung durch die Interaktion mit Fibronektin gesteigert wird. Die Spaltung war abhängig von der Aktivität der Caspase-3 und konnte durch den spezifischen Inhibitor z-DEVD-fmk gehemmt werden. Die Hemmung der Caspase-3 führt parallel dazu zu einer dosisabhängigen Inhibition der TNF $\alpha$ -vermittelten Apoptose. Es ist möglich, daß das generierte 23-kDa-Fragment für die Akzeleration der Apoptose auf Matrix verantwortlich ist. Ein weiterer Mechanismus könnte allerdings auch die durch die Spaltung bewirkte Inaktivierung des intakten Ly-GDI-Proteins sein. Für die letztere Hypothese spricht die Tatsache, daß gespaltenes Ly-GDI die Fähigkeit verliert, die Funktionen der Rho-GTPase zu regulieren (Danley, 1996). Die Resultate aus einem Modell einer Ly-GDI-K.O.-Maus zeigen eine kausale Bedeutung von Ly-GDI bei der Apoptose von Lymphozyten, die durch Wachstumsfaktorentzug induziert wurde (Yin, 1997).

Im Gegensatz dazu demonstrieren wir, daß ein 19-kDa-Fragment konstitutionell, auch in frisch isolierten Zellen, vorhanden ist. Dieses Fragment wird durch Caspase-1 generiert (Danley, 1996). Die Blockierung der Caspase-1 zeigte keine Dosis-Wirkungsbeziehung, wenn die TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose untersucht wurde.

Die in den vorgelegten Untersuchungen charakterisierten Signaltransduktionsereignisse sind in Abbildung 48 schematisch dargestellt.

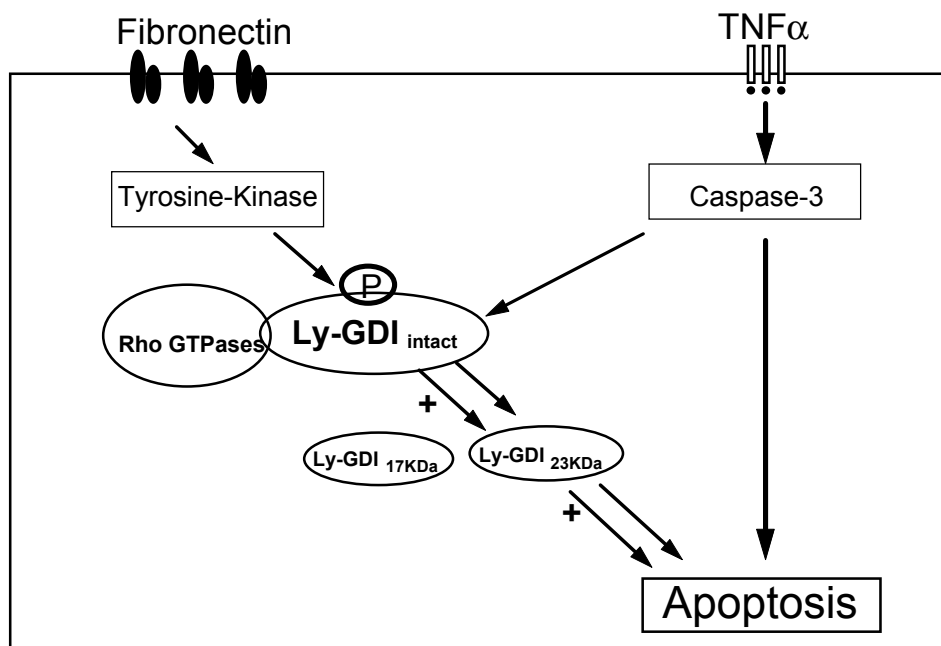


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Signaltransduktion der Matrix-induzierten Akzeleration von  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelter Apoptose in neutrophilen Granulozyten

Unsere Untersuchungen haben demonstriert, daß die Interaktion zwischen  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten neutrophilen Granulozyten und extrazellulären Matrixproteinen zu einer Akzeleration der Apoptose führt. Analysen der zugrunde liegenden Signaltransduktion zeigen, daß die Tyrosin-Phosphorylierung von Ly-GDI, gefolgt von der gesteigerten Spaltung von Ly-GDI, neue, bisher unbekannte intrazelluläre Ereignisse bei der Matrix-akzelerierten Neutrophilen-Apoptose darstellen. Dieser Matrix-abhängige Mechanismus hat potentielle Bedeutung für die Kontrolle von lokalen Entzündungsreaktionen *in vivo* einschließlich derer bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden. So wäre es denkbar, daß der selbstlimitierende Charakter örtlicher Entzündungsreaktionen durch die Steigerung der Apoptose im Gewebe unterstützt würde. Dabei würden mehr neutrophile Granulozyten apoptotische Signale auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und phagozytiert werden. Da diese Phagozytose die Desintegration apoptotischer Neutrophiler verhindert, ohne zu einer Aktivierung der Phagozyten zu führen, wäre eine anti-entzündliche Wirkung die Folge. Im Gegensatz dazu könnte sich die Akzeleration der Apoptose in einem Tempo vollziehen, das zu einer Überforderung des "Abräumsystems" führt. Die Phagozyten könnten unter diesen Umständen mit der Generation apoptotischer neutrophiler Granulozyten nicht schritthalten. Aktivierte früh-apoptotische Zellen, die nicht beseitigt wurden, würden weiterhin Sauerstoffradikale generieren. Im spätapoptotischen Stadium würde es zum Zellerfall kommen und dabei zur Freisetzung gewebschädigender Bestandteile aus den Granula. Das letztere Szenario hätte eine proinflammatorische Wirkung und erinnert an die leukozytoklastische Vaskulitis bei Patienten mit ANCA-assoziierten Erkrankungen.



## **5 Nachwort**

Die vorgelegte Habilitationsschrift baut auf experimentellen Untersuchungen auf, die im wesentlichen zwischen 1994 und 1998 durchgeführt wurden.

Anfangen hat meine wissenschaftliche Beschäftigung mit dieser Form der Vaskulitiden vor 15 Jahren, drei Jahre nach der Erstbeschreibung der ANCA. Wir haben seitdem mehr als 150 Patienten mit systemischen Vaskulitiden behandelt. Einen wesentlichen Anteil an meinem klinischen und wissenschaftlichen Werdegang hatten in diesen Anfangsjahren Herr Prof. Dr. Rudolph Natusch und Frau PD Dr. Ursula Göbel. Beide haben es auf ganz unterschiedliche Weise verstanden, mein Interesse für ANCA-assoziierte Erkrankungen zu wecken.

Durch die Anregung und die Hilfe von Prof. Dr. Friedrich C. Luft habe ich begonnen, mich für den naturwissenschaftlichen Aspekt der ANCA-Vaskulitiden zu interessieren. Die ersten Arbeiten zu Mechanismen der Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA wurden dann in den Jahren 1994-1996 in Chapel Hill, N.C. in der Arbeitsgruppe von Prof. Ron Falk und Prof. Charles Jennette durchgeführt. Diese Zeit im Labor hat mich mit den vielfältigsten Aspekten der Vaskulitis vertraut gemacht. Beide haben durch zahlreiche motivierende Diskussionen und Anregungen meine Forschungstätigkeit gefördert.

Die experimentellen Untersuchungen wurden nach meiner Rückkehr aus Chapel Hill in Berlin fortgesetzt. Prof. Dr. Friedrich C. Luft sowie Prof. Dr. Hermann Haller haben mich dabei kontinuierlich unterstützt. Ihr Rat und ihre Hilfe waren in den letzten Jahren von besonderem Wert.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Labors, ohne deren unermüdliches Engagement diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

## Literatur

- Adachi, S., Kubota, M., Lin, Y. W., Okuda, A., Matsubara, K., Wakazono, Y., Hirota, H., Kuwakado, K., and Akiyama, Y. (1994). In vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor promotes neutrophil survival in vitro. *Eur J Haematol* 53, 129-34.
- Ahuja, S. K., Gao, J. L., and Murphy, P. M. (1994). Chemokine receptors and molecular mimicry. *Immunol Today* 15, 281-7.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. *Cell* 87, 171.
- Andonegui, G., Trevani, A. S., Lopez, D. H., Raiden, S., Giordano, M., and Geffner, J. R. (1997). Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets. *J Immunol* 158, 3372-7.
- Athens, J. W., Haab, O. P., Raab, S. O., Mauer, A. M., Ashenbrucker, H., Cartwright, G. E., and Wintrobe, M. M. (1961). Leukokinetic Studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest* 40, 989-995.
- Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55, 97-179.
- Ballieux, B. E., Hiemstra, P. S., Klar Mohamad, N., Hagen, E. C., van Es, L. A., van der Woude, F. J., and Daha, M. R. (1994). Detachment and cytolysis of human endothelial cells by proteinase 3. *Eur J Immunol* 24, 3211-5.
- Berger, S. P., Seelen, M. A., Hiemstra, P. S., Gerritsma, J. S., Heemskerk, E., van der Woude, F. J., and Daha, M. R. (1996). Proteinase 3, the major autoantigen of Wegener's granulomatosis, enhances IL-8 production by endothelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol* 7, 694-701.
- Bokoch, G. M., and Der, C. J. (1993). Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *Faseb J* 7, 750-9.
- Brown, E. J., and Goodwin, J. L. (1988). Fibronectin receptors of phagocytes. Characterization of the Arg-Gly-Asp binding proteins of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 167, 777-93.
- Brown, S. B., Bailey, K., and Savill, J. (1997). Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J* 323, 233-7.
- Casciola Rosen, L. A., Anhalt, G. J., and Rosen, A. (1995). DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med* 182, 1625-34.
- Casciola Rosen, L. A., Miller, D. K., Anhalt, G. J., and Rosen, A. (1994). Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem* 269, 30757-60.
- Charles, L. A., Caldas, M. L., Falk, R. J., Terrell, R. S., and Jennette, J. C. (1991). Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J Leukoc Biol* 50, 539-46.
- Churg, J., and Strauss, L. (1951). Allergic granulomatosis, allergic angiitis, and periarteritis nodosa. *Am J Pathol* 27, 277-294.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80, 2012-20.
- Cox, G., and Austin, R. C. (1997). Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J Leukoc Biol* 61, 224-30.
- Cox, G., Gauldie, J., and Jordana, M. (1992). Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 507-13.
- Crockett Torabi, E., and Fantone, J. C. (1990). Soluble and insoluble immune complexes activate human neutrophil NADPH oxidase by distinct Fc gamma receptor-specific mechanisms. *J Immunol* 145, 3026-32.

- Csernok, E., Ernst, M., Schmitt, W., Bainton, D. F., and Gross, W. L. (1994). Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol* 95, 244-50.
- Danley, D. E., Chuang, T. H., and Bokoch, G. M. (1996). Defective Rho GTPase regulation by IL-1 beta-converting enzyme-mediated cleavage of D4 GDP dissociation inhibitor. *J Immunol* 157, 500-3.
- Davies, D. J., Moran, J. E., Niall, J. F., and Ryan, G. B. (1982). Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J Clin Res Ed* 285, 606.
- Delia, D., Aiello, A., Soligo, D., Fontanella, E., Melani, C., Pezzella, F., Pierotti, M. A., and Della Porta, G. (1992). bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. *Blood* 79, 1291-8.
- Deng, H. X., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W. Y., Getzoff, E. D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R. P., and et al. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase [see comments]. *Science* 261, 1047-51.
- Detmers, P. A., Lo, S. K., Olsen Egbert, E., Walz, A., Baggiolini, M., and Cohn, Z. A. (1990). Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding of the  $\alpha$ -ion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* 171, 1155-62.
- Donald, K. J., Edwards, R. L., and McEvoy, J. D. (1976). An ultrastructural study of the pathogenesis of tissue injury in limited Wegener's granulomatosis. *Pathology* 8, 161-9.
- Downey, G. P., Butler, J. R., Tapper, H., Fialkow, L., Saltiel, A. R., Rubin, B. B., and Grinstein, S. (1998). Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J Immunol* 160, 434-43.
- Dransfield, I., Buckle, A. M., Savill, J. S., McDowall, A., Haslett, C., and Hogg, N. (1994). Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol* 153, 1254-63.
- Eckerskorn, C., Jungblut, P., Mewes, W., Klose, J., and Lottspeich, F. (1988). Identification of mouse brain proteins after two-dimensional electrophoresis and electroblotting by microsequence analysis and amino acid composition analysis. *Electrophoresis* 9, 830-8.
- Edgeworth, J., Gorman, M., Bennett, R., Freemont, P., and Hogg, N. (1991). Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *J Biol Chem* 266, 7706-13.
- Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W. W., Kamen, R., Weichselbaum, R., and et al. (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *Embo J* 14, 6148-56.
- Enokido, Y., and Hatanaka, H. (1993). Apoptotic cell death occurs in hippocampal neurons cultured in a high oxygen atmosphere. *Neuroscience* 57, 965-72.
- Ewert, B. H., Jennette, J. C., and Falk, R. J. (1992). Anti-myeloperoxidase antibodies stimulate neutrophils to damage human endothelial cells. *Kidney Int* 41, 375-83.
- Falk, R. J., and Jennette, J. C. (1988). Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 318, 1651-7.
- Falk, R. J., Terrell, R. S., Charles, L. A., and Jennette, J. C. (1990). Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4115-9.
- Folkman, J., and Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273, 345-9.

- Furuke, K., Sasada, T., Ueda Taniguchi, Y., Yamauchi, A., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Masutani, H., and Yodoi, J. (1997). Role of intracellular redox status in apoptosis induction of human T-cell leukemia virus type I-infected lymphocytes by 13-cis-retinoic acid. *Cancer Res* 57, 4916-23.
- Gamberale, R., Giordano, M., Trevani, A. S., Andonegui, G., and Geffner, J. R. (1998). Modulation of human neutrophil apoptosis by immune complexes. *J Immunol* 161, 3666-74.
- Geiser, T., Dewald, B., Ehrenguber, M. U., Clark-Lewis, I., and Baggiolini, M. (1993). The Interleukin-8-related chemotactic cytokines Groa, Gro $\beta$ , and Grog activate neutrophil and basophil leukocytes. *J Biol Chem* 268, 15419-15424.
- Gilligan, H. M., Bredy, B., Brady, H. R., Hebert, M. J., Slayter, H. S., Xu, Y., Rauch, J., Shia, M. A., Koh, J. S., and Levine, J. S. (1996). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies interact with primary granule constituents on the surface of apoptotic neutrophils in the absence of neutrophil priming. *J Exp Med* 184, 2231-41.
- Ginis, I., and Faller, D. V. (1997). Protection from apoptosis in human neutrophils is determined by the surface of adhesion. *Am J Physiol* 272, C295-309.
- Girard, D., Paquet, M. E., Paquin, R., and Beaulieu, A. D. (1996). Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 88, 3176-84.
- Girard, D., Paquin, R., and Beaulieu, A. D. (1997). Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 325, 147-53.
- Godman, G., and Churg, J. (1954). Wegener's granulomatosis. Pathology and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 58, 533-553.
- Goldschmeding, R., van der Schoot, C. E., ten Bokkel Huinink, D., Hack, C. E., van den Ende, M. E., Kallenberg, C. G., and von dem Borne, A. E. (1989). Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J Clin Invest* 84, 1577-87.
- Gorvel, J. P., Chang, T. C., Boretto, J., Azuma, T., and Chavrier, P. (1998). Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS Lett* 422, 269-73.
- Greenlund, L. J., Deckwerth, T. L., and Johnson, E. M., Jr. (1995). Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14, 303-15.
- Grigg, J. M., Savill, J. S., Sarraf, C., Haslett, C., and Silverman, M. (1991). Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs. *Lancet* 338, 720-2.
- Haller, H., Eichhorn, J., Pieper, K., Gobel, U., and Luft, F. C. (1996). Circulating leukocyte integrin expression in Wegener's granulomatosis. *J Am Soc Nephrol* 7, 40-8.
- Hannah, S., Mecklenburgh, K., Rahman, I., Bellingan, G. J., Greening, A., Haslett, C., and Chilvers, E. R. (1995). Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Lett* 372, 233-7.
- Haslett, C., Savill, J. S., Whyte, M. K., Stern, M., Dransfield, I., and Meagher, L. C. (1994). Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345, 327-33.
- Hessian, P. A., Edgeworth, J., and Hogg, N. (1993). MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol* 53, 197-204.
- Hoch, R. C., Schraufstatter, I. U., and Cochrane, C. G. (1996). In vivo, in vitro, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. *J Lab Clin Med* 128, 134-45.
- Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Millman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-51.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R. D., and Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-6.
- Homburg, C. H., de Haas, M., von dem Borne, A. E., Verhoeven, A. J., Reutelingsperger, C. P., and Roos, D. (1995). Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85, 532-40.

- Howard, T. H., and Watts, R. G. (1994). Actin polymerization and leukocyte function. *Curr Opin Hematol* 1, 61-8.
- Hughes, J., Johnson, R. J., Mooney, A., Hugo, C., Gordon, K., and Savill, J. (1997). Neutrophil fate in experimental glomerular capillary injury in the rat. Emigration exceeds in situ clearance by apoptosis. *Am J Pathol* 150, 223-34.
- Huizinga, T. W., Dolman, K. M., van der Linden, N. J., Kleijer, M., Nuijens, J. H., von dem Borne, A. E., and Roos, D. (1990). Phosphatidylinositol-linked FcRIII mediates exocytosis of neutrophil granule proteins, but does not mediate initiation of the respiratory burst. *J Immunol* 144, 1432-7.
- Iwai, K., Miyawaki, T., Takizawa, T., Konno, A., Ohta, K., Yachie, A., Seki, H., and Taniguchi, N. (1994). Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood* 84, 1201-8.
- Jacobson, M. D., Burne, J. F., King, M. P., Miyashita, T., Reed, J. C., and Raff, M. C. (1993). Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361, 365-9.
- Jennette, J. C. (1991). Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated diseases: a pathologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 18, 164-70.
- Jennette, J. C., and Falk, R. J. (1997). Small-vessel vasculitis. *N-Engl-J-Med* 337, 1512-23.
- Jennette, J. C., Falk, R. J., Andrassy, K., Bacon, P. A., Churg, J., Gross, W. L., Hagen, E. C., Hoffman, G. S., Hunder, G. G., Kallenberg, C. G. M., McCluskey, R. T., Sinico, R. A., Rees, A. J., van Es, L. A., Waldherr, R., and Wiik, A. (1994). Nomenclature of systemic vasculitides: the proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 37, 187-192.
- Johnson, P. A., Alexander, H. D., McMillan, S. A., and Maxwell, A. P. (1997). Up-regulation of the granulocyte adhesion molecule Mac-1 by autoantibodies in autoimmune vasculitis. *Clin Exp Immunol* 107, 513-9.
- Joneson, T., and Bar Sagi, D. (1997). Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis. *J Mol Med* 75, 587-93.
- Kallenberg, C. G., Brouwer, E., Weening, J. J., and Tervaert, J. W. (1994). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int* 46, 1-15.
- Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T., and Bredesen, D. E. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262, 1274-7.
- Kasahara, Y., Iwai, K., Yachie, A., Ohta, K., Konno, A., Seki, H., Miyawaki, T., and Taniguchi, N. (1997). Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood* 89, 1748-53.
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., and Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53, 3976-85.
- Kayalar, C., Ord, T., Testa, M. P., Zhong, L. T., and Bredesen, D. E. (1996). Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2234-8.
- Kekow, J., Szymkowiak, C. H., Sticherling, M., Schroder, J. M., Christophers, E., and Gross, W. L. (1993). Pro- and anti-inflammatory cytokines in primary systemic vasculitis. *Adv Exp Med Biol* 336, 341-4.
- Keogan, M. T., Esnault, V. L., Green, A. J., Lockwood, C. M., and Brown, D. L. (1992). Activation of normal neutrophils by anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Exp Immunol* 90, 228-34.
- Keogan, M. T., Rifkin, I., Ronda, N., Lockwood, C. M., and Brown, D. L. (1993). Anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) increase neutrophil adhesion to cultured human endothelium. *Adv Exp Med Biol* 336, 115-9.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.
- Klose, J., and Kobalz, U. (1995). Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16, 1034-59.

- Koike, T., Harada, N., Yoshida, T., and Morikawa, M. (1992). Regulation of myeloid-specific calcium binding protein synthesis by cytosolic protein kinase C. *J Biochem Tokyo* 112, 624-30.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Koths, K., Kwiatkowski, D. J., and Williams, L. T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-8.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L., and Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* 9, 1277-87.
- Kuijpers, T. W., Hoogerwerf, M., Kuijpers, K. C., Schwartz, B. R., and Harlan, J. M. (1992). Cross-linking of sialophorin (CD43) induces neutrophil aggregation in a CD18-dependent and a CD18-independent way. *J Immunol* 149, 998-1003.
- Kussmaul, A., and Maier, R. (1866). Über eine bisher nicht beschriebene eigenthümliche Arterienerkrankung (Periarteriitis nodosa), die mit Morbus Brightii und rapid fortschreitender allgemeiner Muskellähmung einhergeht. *Dtsch Arch Klin Med* 1, 484-518.
- L'Heureux, G. P., Bourgoin, S., Lean, N., McColl, S. R., and Naccache, P. H. (1995). Diverging signal transduction pathways activated by interleukin-8 and related chemokines in human neutrophils: Interleukin-8, but not NAP-2 or Groa, stimulates phospholipase D activity. *Blood* 85, 522-531.
- Lagasse, E., and Weissman, I. L. (1994). bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages. *J Exp Med* 179, 1047-52.
- Lamoyi, E. (1986). Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments from mouse IgG of various subclasses. *Methods Enzymol* 121, 652-63 Issn: 0076-6879.
- Laster, S. M., Wood, J. G., and Gooding, L. R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 141, 2629-34.
- Lee, A., Whyte, M. K., and Haslett, C. (1993). Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 54, 283-8.
- Lee, J., Horuk, R., Rice, G. C., Bennett, G. L., Camerato, T., and Wood, W. I. (1992). Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J Biol Chem* 267, 16283-7.
- Lemarchand, P., Vaglio, M., Mauel, J., and Markert, M. (1992). Translocation of a small cytosolic calcium-binding protein (MRP-8) to plasma membrane correlates with human neutrophil activation. *J Biol Chem* 267, 19379-82.
- Li, P. F., Dietz, R., and von Harsdorf, R. (1997). Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 96, 3602-9.
- Liles, W. C., Kiener, P. A., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., and Klebanoff, S. J. (1996). Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* 184, 429-40.
- Loo, D. T., Copani, A., Pike, C. J., Whittemore, E. R., Walencewicz, A. J., and Cotman, C. W. (1993). Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7951-5.
- Ludemann, J., Utecht, B., and Gross, W. L. (1990). Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 171, 357-62.

- Lugering, N., Kucharzik, T., Lugering, A., Winde, G., Sorg, C., Domschke, W., and Stoll, R. (1997). Importance of combined treatment with IL-10 and IL-4, but not IL-13, for inhibition of monocyte release of the Ca(2+)-binding protein MRP8/14. *Immunology* 91, 130-4.
- Martin, S. J., and Green, D. R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82, 349-52.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545-56.
- Martin, U., Bock, D., Arseniev, L., Tornetta, M. A., Ames, R. S., Bautsch, W., Kohl, J., Ganser, A., and Klos, A. (1997). The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes. *J Exp Med* 186, 199-207.
- Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D. K., Nicholson, D. W., and Tsuruo, T. (1997). Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 14, 1007-12.
- Masure, S., Proost, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1991). Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur J Biochem* 198, 391-8.
- Mayet, W. J., and Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1993). Antibodies to proteinase 3 increase adhesion of neutrophils to human endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 94, 440-6.
- Miller, M. D., and Krangel, M. S. (1992). Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 12, 17-46.
- Muller Kobold, A. C., Kallenberg, C. G., and Tervaert, J. W. (1998). Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Br J Rheumatol* 37, 901-7.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T. A., Dyer, M. J., Mason, D. Y., and Greaves, M. F. (1992). Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem* 40, 1819-25.
- Moodie, F. D., Leaker, B., Cambridge, G., Totty, N. F., and Segal, A. W. (1993). Alpha-enolase: a novel cytosolic autoantigen in ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 43, 675-81 Issn: 0085-2538.
- Morgan, B. P., van den Berg, C. W., Davies, E. V., Hallett, M. B., and Horejsi, V. (1993). Cross-linking of CD59 and of other glycosyl phosphatidylinositol-anchored molecules on neutrophils triggers cell activation via tyrosine kinase. *Eur J Immunol* 23, 2841-50.
- Moser, B., Schumacher, C., von Tscherner, V., Clark Lewis, I., and Baggiolini, M. (1991). Neutrophil-activating peptide 2 and gro/melanoma growth-stimulatory activity interact with neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 receptors on human neutrophils. *J Biol Chem* 266, 10666-71.
- Mulder, A. H., Heeringa, P., Brouwer, E., Limburg, P. C., and Kallenberg, C. G. (1994). Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a Fc gamma RII-dependent process. *Clin Exp Immunol* 98, 270-8.
- Murthy, A. R., Lehrer, R. I., Harwig, S. S., and Miyasaki, K. T. (1993). In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex. *J Immunol* 151, 6291-301.
- Na, S., Chuang, T. H., Cunningham, A., Turi, T. G., Hanke, J. H., Bokoch, G. M., and Danley, D. E. (1996). D4-GDI, a substrate of CPP32, is proteolyzed during Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271, 11209-13.
- Nathan, C., Srimal, S., Farber, C., Sanchez, E., Kabbash, L., Asch, A., Gailit, J., and Wright, S. D. (1989). Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol* 109, 1341-9.
- Neamati, N., Fernandez, A., Wright, S., Kiefer, J., and McConkey, D. J. (1995). Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *J Immunol* 154, 3788-95.
- Newton, R. A., and Hogg, N. (1998). The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunol* 160, 1427-35.

- Niles, J. L., McCluskey, R. T., Ahmad, M. F., and Arnaout, M. A. (1989). Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase [see comments]. *Blood* 74, 1888-93.
- Noronha, I. L., Kruger, C., Andrassy, K., Ritz, E., and Waldherr, R. (1993). In situ production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis. *Kidney Int* 43, 682-92.
- Nowack, R., Flores Suarez, L. F., and van der Woude, F. J. (1998). New developments in pathogenesis of systemic vasculitis. *Curr-Opin-Rheumatol* 10, 3-11.
- Ohtsu, M., Sakai, N., Fujita, H., Kashiwagi, M., Gasa, S., Shimizu, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Sakiyama, Y., Kobayashi, K., and Kuzumaki, N. (1997). Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *Embo J* 16, 4650-6.
- Oppenheim, J. J., Zachariae, C. O., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9, 617-48.
- Osterland, C. K., Harboe, M., and Kunkel, H. G. (1993). Anti-gammaglobulin factors in human sera revealed by enzymatic splitting of anti-Rh antibodies. *Vox Sang* 1963;8:133-52. *Vox Sang* 64, 246-7.
- Otto, A., Thiede, B., Muller, E. C., Scheler, C., Wittmann Liebold, B., and Jungblut, P. (1996). Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry. *Electrophoresis* 17, 1643-50.
- Polunovsky, V. A., Wendt, C. H., Ingbar, D. H., Peterson, M. S., and Bitterman, P. B. (1994). Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res* 214, 584-94.
- Porges, A. J., Redecha, P. B., Kimberly, W. T., Csernok, E., Gross, W. L., and Kimberly, R. P. (1994). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIla. *J Immunol* 153, 1271-80.
- Quinn, M. T. (1995). Low-molecular-weight GTP-binding proteins and leukocyte signal transduction. *J Leukoc Biol* 58, 263-76.
- Rammes, A., Roth, J., Goebeler, M., Klempt, M., Hartmann, M., and Sorg, C. (1997). Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem* 272, 9496-502.
- Rasmussen, A. M., Blomhoff, H. K., Stokke, T., Horejsi, V., and Smeland, E. B. (1994). Cross-linking of CD53 promotes activation of resting human B lymphocytes. *J Immunol* 153, 4997-5007.
- Ravid, A., Novogrodsky, A., and Wilchek, M. (1978). Grafting of triggering sites onto lymphocytes: requirement of multivalency in the stimulation of dinitrophenyl-modified thymocytes by anti-dinitrophenyl antibody. *Eur J Immunol* 8, 289-94.
- Reed, J. C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124, 1-6.
- Reumaux, D., Vossebeld, P. J., Roos, D., and Verhoeven, A. J. (1995). Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fc gamma receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood* 86, 3189-95.
- Richter, J., Ng Sikorski, J., Olsson, I., and Andersson, T. (1990). Tumor necrosis factor-induced degranulation in adherent human neutrophils is dependent on CD11b/CD18-integrin-triggered oscillations of cytosolic free Ca<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9472-6.
- Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J. E., and Galand, P. (1991). Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 138, 447-53.



- Rooszendaal, C., Zhao, M. H., Horst, G., Lockwood, C. M., Kleibeuker, J. H., Limburg, P. C., Nelis, G. F., and Kallenberg, C. G. (1998). Catalase and alpha-enolase: two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 112, 10-6 Issn: 0009-9104.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., and et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis [published erratum appears in *Nature* 1993 Jul 22;364(6435):362] [see comments]. *Nature* 362, 59-62.
- Rossi, A. G., Cousin, J. M., Dransfield, I., Lawson, M. F., Chilvers, E. R., and Haslett, C. (1995). Agents that elevate cAMP inhibit human neutrophil apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 892-9.
- Roth, J., Burwinkel, F., van den Bos, C., Goebeler, M., Vollmer, E., and Sorg, C. (1993). MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood* 82, 1875-83.
- Rudel, T., and Bokoch, G. M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276, 1571-4.
- Sandstrom, P. A., Mannie, M. D., and Buttkie, T. M. (1994). Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *J Leukoc Biol* 55, 221-6.
- Savill, J. (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 61, 375-80.
- Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M., and Haslett, C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83, 865-75.
- Scherle, P., Behrens, T., and Staudt, L. M. (1993). Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7568-72.
- Shen, F., Xu, X. L., Graf, L. H., and Chong, A. S. (1995). CD45-cross-linking stimulates IFN-gamma production in NK cells. *J Immunol* 154, 644-52.
- Shinagawa, T., Yoshioka, K., Kakumu, S., Wakita, T., Ishikawa, T., Itoh, Y., and Takayanagi, M. (1991). Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effects of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Pathol* 165, 247-53.
- Song, Q., Wei, T., Lees Miller, S., Alnemri, E., Watters, D., and Lavin, M. F. (1997). Resistance of actin to cleavage during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 157-62.
- Stegeman, C. A., Tervaert, J. W., Sluiter, W. J., Manson, W. L., de Jong, P. E., and Kallenberg, C. G. (1994). Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis [see comments]. *Ann Intern Med* 120, 12-7 Issn: 0003-4819.
- Sugiyama, H., Kashihara, N., Makino, H., Yamasaki, Y., and Ota, Z. (1996). Reactive oxygen species induce apoptosis in cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 7, 2357-63.
- Taekema Roelvink, M. E., van Kooten, C., Janssens, M. C., Heemskerk, E., and Daha, M. R. (1998). Effect of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies on proteinase 3-induced apoptosis of human endothelial cells. *Scand J Immunol* 48, 37-43.
- Takeda, Y., Watanabe, H., Yonehara, S., Yamashita, T., Saito, S., and Sendo, F. (1993). Rapid acceleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha. *Int Immunol* 5, 691-4.
- Tesar, V., Jelinkova, E., Masek, Z., Jirsa, M., Jr., Zabka, J., Bartunkova, J., Stejskalova, A., Janatkova, I., and Zima, T. (1998). Influence of plasma exchange on serum levels of cytokines and adhesion molecules in ANCA-positive renal vasculitis. *Blood Purif* 16, 72-80.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-62.

- van der Woude, F. J., Rasmussen, N., Lobatto, S., Wiik, A., Permin, H., van Es, L. A., van der Giessen, M., van der Hem, G. K., and Hauw The, T. (1985). Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker for disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet i*, 425-429.
- Voelkel Johnson, C., Entingh, A. J., Wold, W. S., Gooding, L. R., and Laster, S. M. (1995). Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis. *J Immunol* 154, 1707-16.
- Wade, B. H., and Mandell, G. L. (1983). Polymorphonuclear leukocytes: dedicated professional phagocytes. *Am J Med* 74, 686-93.
- Waldherr, R., Noronha, I. L., Niemir, Z., Kruger, C., Stein, H., and Stumm, G. (1993). Expression of cytokines and growth factors in human glomerulonephritides. *Pediatr Nephrol* 7, 471-8.
- Watson, R. W., Rotstein, O. D., Nathens, A. B., Parodo, J., and Marshall, J. C. (1997). Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. *J Immunol* 158, 945-53.
- Wegener, F. (1939). Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren. *Beitr Pathol Anat* 102, 36-68.
- Wen, L. P., Fahrni, J. A., Troie, S., Guan, J. L., Orth, K., and Rosen, G. D. (1997). Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem* 272, 26056-61.
- Wesch, D., Marx, S., and Kabelitz, D. (1998). Monocyte-dependent death of freshly isolated T lymphocytes: induction by phorbol ester and mitogens and differential effects of catalase. *J Immunol* 161, 1248-56.
- Westlin, W. F., Kiely, J. M., and Gimbrone, M. A., Jr. (1992). Interleukin-8 induces changes in human neutrophil actin conformation and distribution: relationship to inhibition of adhesion to cytokine-activated endothelium. *J Leukoc Biol* 52, 43-51.
- Whyte, M. K., Meagher, L. C., MacDermot, J., and Haslett, C. (1993). Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol* 150, 5124-34.
- Wissing, D., Mouritzen, H., Egeblad, M., Poirier, G. G., and Jaattela, M. (1997). Involvement of caspase-dependent activation of cytosolic phospholipase A2 in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5073-7.
- Wymann, M. P., Kernen, P., Deranleau, D. A., Dewald, B., von Tscharner, V., and Baggiolini, M. (1987). Oscillatory motion in human neutrophils responding to chemotactic stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 147, 361-8.
- Yang, J. J., Ketritz, R., Falk, R. J., Jennette, J. C., and Gaido, M. L. (1996). Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase. *Am J Pathol* 149, 1617-26.
- Yen, T., Harrison, C. A., Devery, J. M., Leong, S., Iismaa, S. E., Yoshimura, T., and Geczy, C. L. (1997). Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. *Blood* 90, 4812-21.
- Yin, L., Schwartzberg, P., Scharton Kersten, T. M., Staudt, L., and Lenardo, M. (1997). Immune responses in mice deficient in Ly-GDI, a lymphoid-specific regulator of Rho GTPases. *Mol Immunol* 34, 481-91.
- Yousefi, S., Green, D. R., Blaser, K., and Simon, H. U. (1994). Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10868-72.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-52.
- Yui, S., Mikami, M., Tsurumaki, K., and Yamazaki, M. (1997). Growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. *J Leukoc Biol* 61, 50-7.

- Zahler, S., Kowalski, C., Brosig, A., Kupatt, C., Becker, B. F., and Gerlach, E. (1997). The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 200, 173-9.
- Zeek, P. M. (1952). Periarthritis nodosa: a critical review. *Am J Clin Pathol* 22, 777-790.
- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R. E., Peschon, J., Lynch, D. H., and Lenardo, M. J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377, 348-51.
- Zwadlo, G., Schlegel, R., and Sorg, C. (1986). A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. *J Immunol* 137, 512-8.